



SKRIPSI – TK141581

**PEMISAHAN XANTHONE DAN COUMARIN
DARI EKSTRAK DAUN NYAMPLUNG
(*Calophyllum inophyllum*) DENGAN METODE
LIQUID – LIQUID EXTRACTION**

Oleh:

Reinaldi Ismawan

NRP. 2311 100 132

Violita Anggraeni

NRP. 2313 105 027

Dosen Pembimbing :

Prof. Dr. Ir. Tri Widjaja, M. Eng

NIP. 1961 10 21 1986 03 1001

Setiyo Gunawan, S.T., Ph.D

NIP. 1976 03 23 2002 12 1001

**JURUSAN TEKNIK KIMIA
FAKULTAS TEKNOLOGI INDUSTRI
INSTITUT TEKNOLOGI SEPULUH NOPEMBER
SURABAYA
2016**



FINAL PROJECT –TK141581

**SEPARATION OF XANTHONE DAN COUMARIN
FROM NYAMPLUNG (*Calophyllum inophyllum*)
LEAVES EXTRACT WITH LIQUID – LIQUID
EXTRACTION METHOD**

By :

**Reinaldi Ismawan
NRP. 2311 100 132
Violita Anggraeni
NRP. 2313 105 027**

Advisor Lecturer :

**Prof. Dr. Ir. Tri Widjaja, M. Eng
NIP. 1961 10 21 1986 03 1001
Setiyo Gunawan, S.T., Ph.D
NIP. 1976 03 23 2002 12 1001**

**CHEMICAL ENGINEERING DEPARTMENT
FACULTY OF INDUSTRIAL TECHNOLOGY
INSTITUT TEKNOLOGI SEPULUH NOPEMBER
SURABAYA
2016**

LEMBAR PENGESAHAN

PEMISAHAN XANTHONE DAN COUMARIN DARI EKSTRAK DAUN NYAMPLUNG (*Calophyllum Inophyllum*) DENGAN METODE LIQUID-LIQUID EXTRACTION

Diajukan Untuk Memenuhi Salah Satu Syarat Memperoleh Gelar
Sarjana Teknik pada Program Studi S-1 Jurusan Teknik Kimia
Institut Teknologi Sepuluh Nopember Surabaya

Oleh:

Reinaldi Ismawan 2311 100 132

Violita Anggraeni 2313 105 027

Disetujui oleh Tim Penguji Tugas Akhir :

1. Prof. Dr. Ir. Tri Widjaja, M. Eng(Pembimbing I)
2. Setiyo Gunawan, S.T., Ph.D(Pembimbing II)
3. Prof. Dr. Ir. Arief Widjaja, M. Eng(Penguji I)
4. Dr. Ir. Kuswandi, DEA(Penguji II)
5. Ir. Rr. Pantjawarni Prihatini(Penguji III)



Surabaya, Januari 2016

PEMISAHAN XANTHONE DAN COUMARIN DARI EKSTRAK DAUN NYAMPLUNG (*Calophyllum inophyllum*) DENGAN METODE LIQUID – LIQUID EXTRACTION

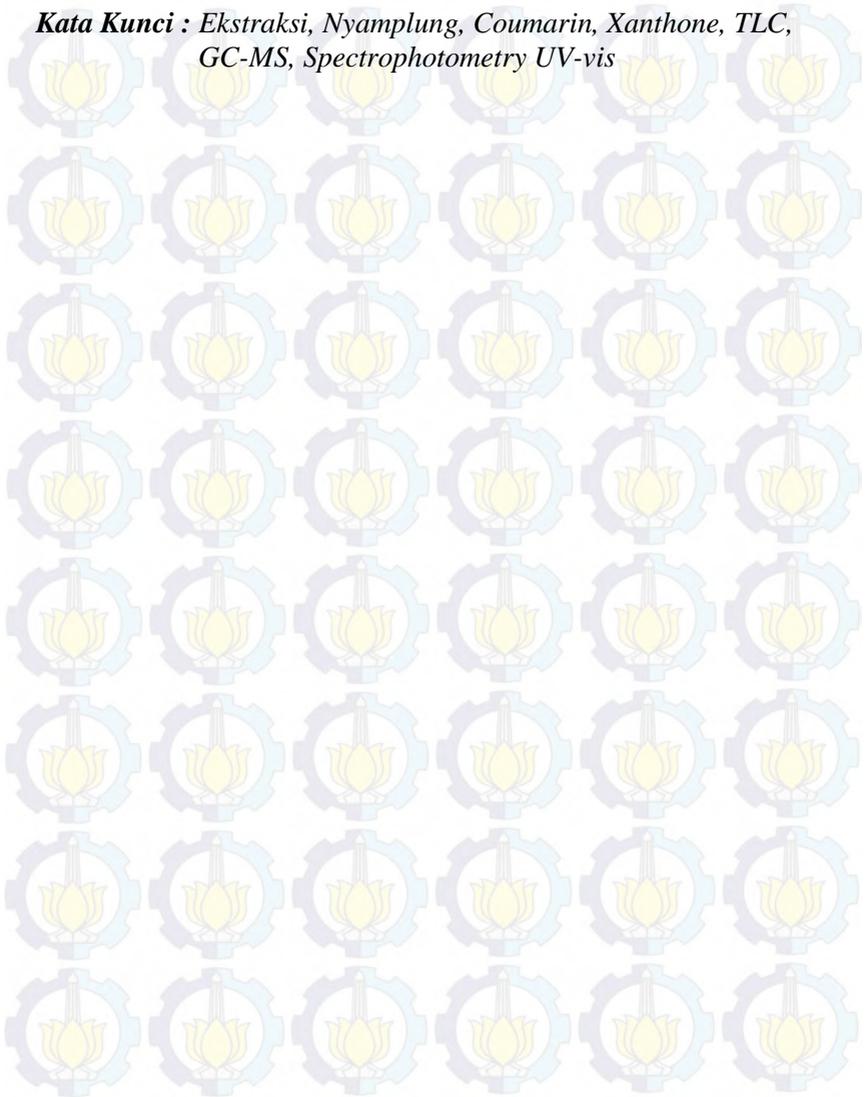
Nama Mahasiswa : 1. Reinaldi Ismawan (2311100132)
2. Violita Anggraeni (2313105027)
Dosen Pembimbing : Prof. Dr. Ir. Tri Widjaja, M. Eng
Setiyo Gunawan, S.T., Ph.D
Jurusan : Teknik Kimia FTI-ITS

ABSTRAK

Calophyllum inophyllum atau yang biasa disebut nyamplung memiliki banyak khasiat yang dapat dimanfaatkan mulai dari akar, batang, daun, hingga biji. Menurut Ling tahun 2009, daun tanaman ini berfungsi mengobati berbagai macam penyakit seperti iritasi pada mata, penyakit kulit, pembengkakan kaki, disentri, migrain, vertigo, dan lain-lain. Menurut Thengane et al, 2006, dalam daun nyamplung, di sinyalir mengandung *agents chemopreventive cancer*, yaitu coumarin dan xanthone sebagai *antimicrobial activity*. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui senyawa bioaktif yang terkandung pada fraksi polar dan non polar daun nyamplung, cara untuk mengisolasi senyawa xanthone dan coumarin, serta mengetahui kondisi proses pemisahan xanthone dan coumarin yang optimum. Bubuk daun nyamplung diekstraksi dengan pelarut metanol untuk mendapatkan *crude* ekstrak daun. *Crude* ekstrak yang didapatkan kemudian dipisahkan fraksi polar dan non polarnya dengan ekstraksi liquid-liquid dengan pelarut metanol - petroleum eter. Variabel pelarut total yang digunakan yaitu 10, 30, 50, serta 70 (g/g) dan rasio perbandingan pelarut polar (metanol) dan non polar (petroleum eter) yaitu 25:75 dan 50:50 (g/g). Kemudian dilakukan pula pemisahan secara berkelanjutan (multiple extraction) sampai fraksi polar dan non polar didapatkan. Fraksi polar dan non polar ekstrak daun yang didapatkan kemudian diuji secara kualitatif menggunakan TLC (*Thin Layer Chromatography*) dan GC-MS (*Gas Chromatography-Mass Spectrometry*), serta secara kuantitatif menggunakan

Spectrophotometry UV-Vis untuk menganalisa kadar coumarin dan xanthone dalam ekstrak daun nyamplung.

Kata Kunci : *Ekstraksi, Nyamplung, Coumarin, Xanthone, TLC, GC-MS, Spectrophotometry UV-vis*



SEPARATION OF XANTHONE DAN COUMARIN FROM NYAMPLUNG (*Calophyllum inophyllum*) LEAVES EXTRACT WITH LIQUID – LIQUID EXTRACTION METHOD

Name : 1. Reinaldi Ismawan (2311100132)
2. Violita Anggraeni (2313105027)
Advisor : Prof. Dr. Ir. Tri Widjaja, M. Eng
Setiyo Gunawan, S.T., Ph.D
Department : Teknik Kimia FTI-ITS

ABSTRACT

Calophyllum inophyllum or also known as nyamplung has many savour which can be used from root, bark, leaves, and seeds. According to Ling, 2009, this nyamplung leaves function is able to cure various diseases such as eye irritation, skin disease, vertigo, etc. According to Thengane et al, 2006, nyamplung leaves are expected to contain *agents chemopreventive cancer*, which are coumarin and xanthone as *antimicrobial activity*. This study aims to identify bioactive compound which is contained in polar and non polar fractions of nyamplung leaves and to determine method to isolate xanthone and coumarin, also to determine the optimum condition for isolating process of xanthone and coumarin. Nyamplung leaves powder was extracted using methanol to obtain crude extract of nyamplung leaves. Crude extract then was separated by polar and non polar fraction using liquid-liquid extraction with methanol - petroleum ether solvents. The liquid-liquid extraction was applied with variable of total solvent which was used 10, 30, 50 and 70 (g/g) and the polar (methanol) – non polar (petroleum ether) solvent ratio 25:75 and 50:50, (g/g). Then obtained too continuing separation (multiple extraction) until polar and non polar fraction was available. Polar and non polar fraction of extract leaves that were obtained then tested using TLC (*Thin Layer Chromatography*) and GC-MS (*Gas Chromatography Mass Spectrometry*) for qualitative analysis, also using and Spectrophotometry UV-Vis for quantitative analysis to analyze coumarin and xanthone content in nyamplung leaves extract.

Keywords : Extraction, **Nyamplung**, Coumarine, Xanthone, TLC, GC-MS, Spectrophotometry UV-Vis

KATA PENGANTAR

Alhamdulillah Puji syukur kami panjatkan kepada Allah SWT yang atas rahmat dan kasih sayang-Nya, kami dapat menyelesaikan Proposal Tugas Akhir dengan judul "PEMISAHAN XANTHONE DAN C OUMARIN DARI EKSTRAK DAUN NYAMPLUNG (*Calophyllum Inophyllum*) DENGAN METODE LIQUID-LIQUID EXTRACTION". Tugas akhir ini merupakan salah satu persyaratan yang harus dilalui mahasiswa Teknik Kimia ITS guna memperoleh gelar sarjana. Tugas Akhir ini kami susun berdasarkan aplikasi ilmu pengetahuan yang terdapat dalam literatur buku maupun data internet, khususnya di Laboratorium Teknologi Biokimia Teknik Kimia FTI-ITS.

Selama penyusunan laporan ini, kami banyak sekali mendapat bimbingan, dorongan, serta bantuan dari banyak pihak. Untuk itu, kami ingin mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada :

1. Bapak Prof. Dr. Ir. Tri Widjaja, M.Eng, selaku Dosen Pembimbing I atas bimbingan, saran, dan motivasi yang diberikan.
2. Bapak Setiyo Gunawan, ST, PhD selaku Dosen Pembimbing II, atas bimbingan, saran, dan motivasi yang telah diberikan.
3. Bapak Prof. Dr. Ir. Arief Widjaja, M.Eng selaku Kepala Laboratorium Teknologi Biokimia, Jurusan Teknik Kimia FTI-ITS, atas bimbingan, saran, dan motivasi yang diberikan.
4. Bapak dan Ibu Dosen Jurusan Teknik Kimia FTI – ITS Surabaya yang telah memberikan ilmunya kepada penulis.

5. Bapak dan Ibu Karyawan Jurusan Teknik Kimia FTI – ITS Surabaya yang telah membantu kelancaran pengumpulan Tugas Akhir penulis.
6. Kedua orang tua kami atas doa, bimbingan, perhatian, dan kasih sayang yang selalu tercurah selama ini.
7. Teman-teman di Laboratorium Teknologi Biokimia dan keluarga Teknik Kimia FTI-ITS Surabaya atas semua dukungan, semangat, serta kerjasamanya.
8. Seluruh pihak yang tidak dapat kami sebutkan satu persatu, yang turut membantu kami.

Kami menyadari masih banyak hal yang perlu diperbaiki dalam Tugas Akhir ini. Saran dan kritik yang membangun sangat kami harapkan.

Surabaya, 27 Januari 2016

Penyusun

(<i>Calophyllum Inophyllum</i>)	II-2
II.1.3 Manfaat dan Kandungan dalam Daun	
Nyamplung.....	II-4
II.1.4 Metode Mendapatkan Ekstrak Daun	
Nyamplung.....	II-14
II.1.5 Identifikasi dan Karakterisasi.....	II-17
II.1.5.1 Metode Kromatografi.....	II-17
II.1.5.1.1 <i>Thin Layer Chromatograph</i>	
(TLC).....	II-17
II.1.5.1.2 <i>Gas Chromatography-Mass</i>	
<i>Spectrometry</i> (GC-MS).....	II-21
II.1.5.1.3 <i>High Performance Liquid</i>	
<i>Chromatography</i> (HPLC).....	II-22
II.1.5.2 Metode Non-Kromatografi.....	II-24
II.1.5.2.1 Immunoassay.....	II-24
II.1.5.2.2 Phytochemical Screening	
Assay.....	II-24
II.1.5.2.3 Fourier-transform Infrared	
Spectroscopy (FTIR).....	II-25
II.1.5.2.4 Spectrophotometer UV-Vis.....	II-25
II.2 Studi Hasil Penelitian Sebelumnya.....	II-26
BAB III METODOLOGI PENELITIAN.....	III-1
III.1 Proses Pemisahan dan Pemurnian Xantone dan	
Coumarin serta Variabel.....	III-1
III.2 Bahan dan Peralatan.....	III-1

III.2.1 Bahan.....	III-1
III.2.2 Peralatan.....	III-2
III.3 Metode Penelitian.....	III-2
III.3.1 Bahan Penelitian.....	III-2
III.3.2 Prosedur Penelitian.....	III-2
III.3.2.1 Ekstraksi Daun Nyamplung dengan <i>Soxhlet Extraction</i>	III-2
III.3.2.2 Pemisahan dan Pemurnian Xanthone dan Coumarin dengan Metode Ekstraksi Liquid-Liquid.....	III-3
III.3.2.3 Analisa Xanthone dan Coumarin Menggunakan TLC.....	III-5
III.3.2.4 Analisa Xanthone dan Coumarin Menggunakan GC-MS.....	III-6
III.3.2.5 Analisa Xanthone dan Coumarin Menggunakan Spectrophotometer UV-Visible.....	III-6
BAB IV HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN...	IV-1
IV.1 Pemisahan dengan Ekstraksi Solid-Liquid.....	IV-1
IV.2 Pemurnian dengan Ekstraksi Liquid-Liquid.....	IV-3
IV.3 Standar Xanthone dan Coumarin.....	IV-5
IV.4 Hasil Analisa Thin Layer Chromatography (TLC).....	IV-6
IV.5 Hasil Analisa Spectrometry UV-Visible.....	IV-9
IV.6 Analisa Pengaruh antara Variabel terhadap	

Hasil Penelitian.....	IV-15
IV.7 Hasil Analisa Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS).....	IV-28
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN.....	V-1
V.1 Kesimpulan.....	V-1
V.2 Saran.....	V-1
DAFTAR PUSTAKA.....	xv
DAFTAR NOTASI.....	xx
APPENDIKS	
RIWAYAT PENULIS	

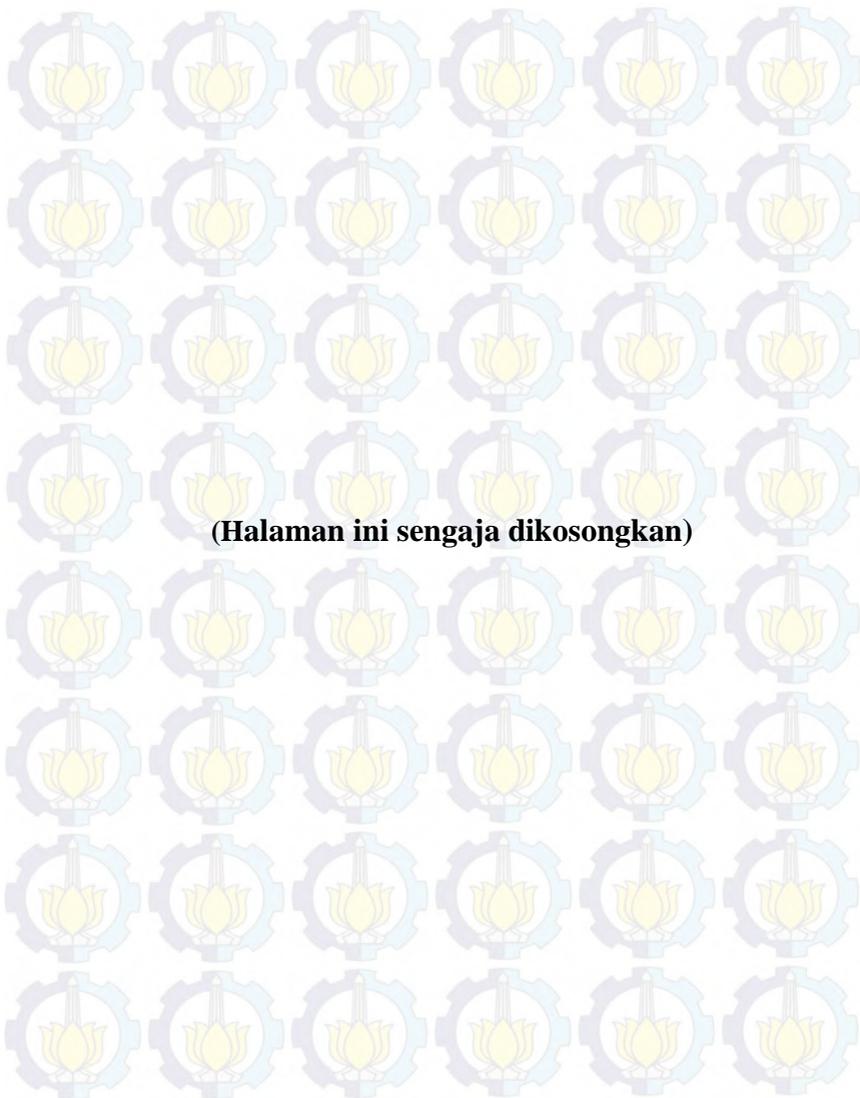
DAFTAR GAMBAR

Gambar II.1	Gambar Persebaran <i>Calophyllum Inophyllum</i> di Dunia.....	II-1
Gambar II.2	Persebaran <i>Calophyllum Inophyllum</i> di Indonesia.....	II-2
Gambar II.3	Bagian-bagian Tanaman Nyamplung.....	II-3
Gambar II.4	Komponen yang Terkandung dalam Nyamplung.....	II-7
Gambar II.5	Kemungkinan Posisi Oksigenasi Xanthone.....	II-8
Gambar II.6	Senyawa Xantone dari Kulit Akar <i>C. Inophyllum</i>	II-9
Gambar II.7	Senyawa Coumarin dari daun <i>C. Inophyllum</i>	II-11
Gambar II.8	Senyawa Benzodipiranon dari Bagian Daun <i>C. Inophyllum</i>	II-12
Gambar II.9	Senyawa Triterpenoid dari Daun <i>C. Inophyllum</i>	II-13
Gambar II.10	Rumus Bangun Sitosterol dan Kolesterol.....	II-13
Gambar II.11	Penggambaran Skema TLC dengan Campuran Dua Komponen.....	II-19
Gambar II.12	$R_f = Y/X$ (selalu ≤ 1).....	II-19
Gambar II.13	Skema Susunan Spektrofotometer UV-VI.....	II-26
Gambar III.1	Skema Tahapan Ekstraksi Daun Nyamplung.....	III-3
Gambar III.2	Skema Pemisahan Xanthone dan Coumarin dari PLF.....	III-4
Gambar III.3	Skema Proses Multiple Extraction Crude Ekstrak Daun Nyamplung.....	III-5
Gambar IV.3.1	Struktur Senyawa Coumarin.....	IV-5
Gambar IV.3.2	Struktur Senyawa Xanthone.....	IV-6
Gambar IV.3.3	Spot Hasil TLC Larutan Standart Xanthone dan Coumarin.....	IV-6
Gambar IV.4.1	Spot Sampel Xanthone dan Coumarin pada Panjang Gelombang yang Berbeda.....	IV-7
Gambar IV.4.2	Hasil TLC Sampel, Larutan Standar Xanthone, dan Larutan Standar Coumarin dengan Menggunakan Mobile Phase Hexane:Etil Asetat:Asam Asetat 90:10:1.....	IV-7
Gambar IV.4.3	Hasil Analisa TLC pada Variabel Pelarut Total 50 dan 70.....	IV-8
Gambar IV.5.1	Grafik Pengaruh Recovery Xanthone dan Coumarin Terhadap Variabel Pelarut Total.....	IV-10

Gambar IV.5.2	Grafik Pengaruh Kadar Xanthone dan Coumarin Terhadap Variabel Pelarut Total.....	IV-12
Gambar IV.5.3	Grafik Pengaruh Yield Xanthone dan Coumarin terhadap Variabel Pelarut Total.....	IV-13
Gambar IV.6.1	Grafik Uji Normalitas Respon Recovery terhadap Variabel, (a) Xanthone, (b) Coumarin.....	IV-18
Gambar IV.6.2	Grafik Uji Normalitas Respon Kadar terhadap Variabel,(a) Xanthone, (b) Coumarin.....	IV-19
Gambar IV.6.3	Grafik Uji Normalitas Respon Yield terhadap Variabel,(a) Xanthone, (b) Coumarin.....	IV-20
Gambar IV.6.4	Hasil ANOVA Pengaruh Variabel terhadap Recovery Xanthone.....	IV-21
Gambar IV.6.5	Hasil ANOVA Pengaruh Variabel terhadap Recovery Coumarin.....	IV-22
Gambar IV.6.6	Hasil ANOVA Pengaruh Variabel terhadap Kadar Xanthone.....	IV-23
Gambar IV.6.7	Hasil ANOVA Pengaruh Variabel terhadap Kadar Coumarin.....	IV-23
Gambar IV.6.8	Hasil ANOVA Pengaruh Variabel terhadap Yield Xanthone.....	IV-24
Gambar IV.6.9	Hasil ANOVA Pengaruh Variabel terhadap Yield Coumarin.....	IV-25
Gambar IV.6.10	Solusi Optimal untuk Seluruh Respon yang Dihasilkan.....	IV-26
Gambar IV.6.11	Hasil Optimasi Variabel dari Design Expert.....	IV-27
Gambar IV.7.1	Hasil Analisa GC-MS untuk Larutan Standar Xanthone.....	IV-29
Gambar IV.7.2	Hasil Analisa GC-MS untuk Larutan Standar Coumarin.....	IV-30
Gambar IV.7.3	Fragmentasi pada Senyawa Xantho.....	IV-31
Gambar IV.7.4	Hasil Analisa GC-MS Fraksi Polar Ekstrak Daun Nyamplung.....	IV-32
Gambar IV.7.5	Hasil Analisa GC-MS Fraksi Non Polar Ekstrak Daun Nyamplung.....	IV-33

DAFTAR NOTASI

Notasi	Keterangan
AIDS	<i>Acquired Immuno Deficiency Syndrome</i>
FTIR	<i>Fourier-transform Infrared Spectroscopy</i>
g	Gram
GC	<i>Gas Chromatography</i>
GC-MS	<i>Gas Chromatography-Mass Spectrometry</i>
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
ml	Mililiter
MS	<i>Mass-Spectrometry</i>
NNRTI	<i>Non-NucleosideReverseTranscriptaseInhibitor</i>
NPLF	<i>Non-Polar Lipid Fraction</i>
PE	<i>Petroleum Ether</i>
PLF	<i>Polar Lipid Fraction</i>
Rf	<i>Retardation Factor</i>
TAG	<i>Triacylglycerol</i>
TLC	<i>Thin-layer chromatography</i>
UV	<i>Ultraviolet</i>



(Halaman ini sengaja dikosongkan)

DAFTAR TABEL

Tabel I.1 <i>Bioactive Compound</i> dalam <i>Calophyllum Inophyllum</i>	I-3
Tabel II.1 Karakteristik Tanaman Nyamplung.....	II-3
Tabel II.2 Manfaat dan Kegunaan Tanaman Nyamplung.....	II-5
Tabel II.3 Polaritas <i>Solvent</i>	II-15
Tabel II.4 Kondisi Operasi untuk Berbagai Macam Proses Ekstraksi.....	II-16
Tabel II.5 Adsorben dan Aplikasinya.....	II-18
Tabel IV.1.1 Perbandingan Metode Ekstraksi yang Digunakan.....	IV-2
Tabel IV.2.1 Polaritas <i>Solvent</i>	IV-4
Tabel IV.5.1 Recovery Xanthone dan Coumarin terhadap Variabel.....	IV-10
Tabel IV.5.2 Kadar Xanthone dan Coumarin terhadap Variabel.....	IV-12
Tabel IV.5.3 Yield Xanthone dan Coumarin terhadap Variabel.....	IV-13
Tabel IV.5.4 Recovery Xanthone dan Coumarin terhadap Variabel pada Tahap Kedua.....	IV-14
Tabel IV.5.5 Recovery Xanthone dan Coumarin terhadap Variabel pada Tahap Ketiga.....	IV-14
Tabel IV.6.1 Hasil Urutan Percobaan dengan Menggunakan Software Design Expert 9.0.3.....	IV-16
Tabel IV.7.1 Daftar Komponen dalam Fraksi Polar yang Teridentifikasi dengan GC-MS.....	IV-34
Tabel IV.7.2 Daftar Komponen dalam Fraksi Non Polar yang Teridentifikasi dengan GC-MS.....	IV-34

BAB I

PENDAHULUAN

I.1 Latar Belakang

Indonesia memiliki beraneka ragam flora hayati yang digunakan untuk pengobatan tradisional. Salah satu tumbuhan tersebut berasal dari genus *Calophyllum*. Tumbuhan yang termasuk genus ini antara lain: *Calophyllum amoenum* Wall, *Calophyllum inophyllum* Linn, *Calophyllum lanigerum* Miq, *Calophyllum venosum* Zoll dan Mor. Tumbuhan *Calophyllum inophyllum* Linn tumbuh subur di berbagai daerah di Indonesia, antara lain: Sumatera, Jawa Tengah, Nusa Tenggara, Sulawesi, dan Bali. Sedangkan spesies yang lain hanya tumbuh di daerah tertentu di Indonesia. *Calophyllum inophyllum* Linn lebih banyak dimanfaatkan dibandingkan tumbuhan dari genus ini (Heyne, 1987).

Tanaman nyamplung (*Calophyllum inophyllum*) merupakan salah satu jenis tumbuhan mangrove. Data yang didapatkan dari National Geographic tahun 2012, luas wilayah mangrove yang terdapat di Indonesia pada tahun 1999 yaitu 8,6 juta hektar. Namun sejak rentang 1999 hingga 2005, hutan bakau tersebut telah berkurang sebanyak 64%. Saat ini luas hutan mangrove di Indonesia pada tahun 2012 hanya mencapai 3,6 juta hektar. Dengan tersebarnya tanaman nyamplung di Indonesia, maka tanaman ini berpotensi besar untuk dijadikan sebagai bahan baku penelitian.

Tanaman nyamplung mengandung banyak komponen kimia yang mengandung bahan bioaktif yang berkhasiat obat yaitu menghasilkan metabolit sekunder dari golongan *Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor* (NNRTI). NNRTI sendiri merupakan kelompok senyawa yang menghambat aktifitas enzim *reverse transcriptase* dari HIV-1 (Pawar et al, 2007).

Pemanfaatan obat tradisional berhubungan dengan senyawa kimia yang terkandung di dalam tumbuhan tersebut. Penelitian tentang isolasi senyawa kimia dari daun *C. inophyllum*. pernah dilakukan oleh Patil (1993), Khan (1996), dan Ali (1999).

Penelitian mereka menghasilkan senyawa yang berbeda. Patil berhasil mengisolasi senyawa coumarin, Khan mengisolasi senyawa benzodipiranon, dan Ali mengisolasi senyawa turunan benzodipiranon, triterpenoid, dan steroid.

Su et al. (2008) menyebutkan bahwa menurut Cechinel Filho et al. (2009), pada berbagai bagian dari pohon *Calophyllum inophyllum* mengandung komponen bioaktif, termasuk diantaranya adalah: xanthones, coumarins, chromanones, tripenes, tripenoids dan steroids. Sedangkan menurut Ling (2009), tanaman ini mengandung senyawa fitokimia yang dapat digunakan sebagai obat untuk berbagai penyakit. Senyawa tersebut diantaranya: Inophynone, Canophyllol, Canophyllic acid, Calophyllolide, Inophyllolide, Jacareubin, Calanolide A, Calophynone, dan lain-lain. Menurut Thengane et al (2006), disadur dari Yimdjo et al (2004), nyamplung mengandung *agents chemopreventive cancer*, xanthone dan coumarins sebagai *antimicrobial activity*. Beberapa pyranocoumarin terisolasi dari genus *Calophyllum* yang menunjukkan aktivitas anti HIV-1 yang termasuk dalam NNRTI. Senyawa ini merupakan golongan turunan senyawa fenol. Senyawa yang menunjukkan aktivitas anti HIV-1 pada *Calophyllum inophyllum* Linn yaitu Inophyllum B dan P (Laure et al, 2008). Menurut penelitian yang dilakukan oleh Laure et al (2008), senyawa coumarin menunjukkan anti HIV yang termasuk ke dalam NNRTI. Coumarin merupakan salah satu metabolit sekunder pada tumbuhan. Senyawa coumarin dan turunannya banyak memiliki aktifitas biologis diantaranya sebagai anti koagulan darah, antibiotik, dan ada juga yang menunjukkan aktifitas menghambat efek karsinogenik (Murray, 1982). Coumarin ditemukan hampir di setiap bagian tumbuh-tumbuhan mulai dari akar, batang, daun sampai bunga dan juga buah (Robinson, 1995).

Sebuah penelitian pada tahun 2011 oleh Ramakhrisnan et al menyebutkan bahwa komponen bioaktif dalam daun nyamplung yang telah diuji menggunakan GC-MS adalah sebagai berikut :

Tabel I.1 Bioactive Compound dalam daun *Calophyllum inophyllum*

No.	RT*	Name of the compounds	Molecular Formula	Molecular Mass	Peak Area (%)
1	10,83	Cyclohexene, 3-(1,5-dimethyl-4-hexenyl)-6-methylene-, [S-(R*,S*)]	C ₁₅ H ₂₄	204	0,76
2	13,72	Tetradecanoic Acid	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	228	0,40
3	14,09	3-Trifluoroacetoxypentadecan	C ₁₇ H ₃₁ F ₃ O ₂	324	0,19
4	14,81	3,7,11,15-Tetramethyl-2-hexadecen-1-ol	C ₂₀ H ₄₀ O	296	4,45
5	15,43	3,7,11,15-Tetramethyl-2-hexadecen-1-ol	C ₂₀ H ₄₀ O	296	1,12
6	15,88	Benzene, (1-Methyldodecyl)-	C ₁₉ H ₃₂	260	1,03
8	16,59	n-Hexadecanoic Acid	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	256	4,57
9	18,92	Phytol	C ₂₀ H ₄₀ O	296	1,00
10	19,24	9,12-Octadecadienoic Acid, Methyl Ester, (E,E)-	C ₁₉ H ₃₄ O ₂	294	2,59
11	19,32	Oleic Acid	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	282	7,41
12	19,66	Octadecanoic Acid	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	284	2,34
13	23,49	Phenol, 2,4-bis(1-phenylethyl)-	C ₂₂ H ₂₂ O	302	1,15
14	25,42	1,2-Benzenedicarboxylic Acid	C ₂₄ H ₃₈ O ₄	390	28,11
15	29,88	Androstan-1 α -ol-17-one,23-isopropylidexy	C ₂₃ H ₃₆ O ₄	376	21,63

Tabel I.1 *Bioactive Compound* dalam daun *Calophyllum inophyllum* (lanjutan)

No.	RT*	Name of the compounds	Molecular Formula	Molecular Mass	Peak Area (%)
16	30,04	Squalene	C ₃₀ H ₅₀	410	10,74
17	30,77	1-Monlinoleoglycerol trimethylsilyl ether	C ₂₇ H ₅₄ O ₄ Si ₂	498	11,80

RT* =Retention Time

Sampai saat ini, telah banyak penelitian yang dilakukan untuk mengetahui potensi-potensi lain yang dapat dihasilkan dari tanaman ini. Sayangnya, dari sekian banyak penelitian yang dilakukan, masih sedikit penelitian yang ditujukan untuk meneliti daun dan senyawa bioaktif yang terdapat didalamnya. Hasil penelitian yang didapatkan oleh Cechinel Filho et al, Su et al dan Laure et al untuk kandungan *bioactive compound* dalam daun nyamplung berbeda satu sama lain. Hal tersebut dapat disebabkan karena perbedaan wilayah tempat bahan baku yang digunakan. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi kandungan *bioactive compound* yang ada dalam daun nyamplung yang tumbuh di Cilacap, Jawa Tengah dan mengambil serta menguantifikasi ekstrak xanthone dan coumarin yang dapat dipergunakan sebagai bahan obat-obatan.

I.2 Rumusan Masalah

Dari latar belakang yang telah diuraikan di atas, maka dapat dirumuskan beberapa masalah yang akan dibahas dalam penelitian ini, yaitu :

1. Senyawa bioaktif apa saja yang terkandung dalam fraksi polar dan non polar daun nyamplung (*Calophyllum inophyllum*)?
2. Bagaimana cara mengisolasi senyawa xanthone dan coumarin yang terkandung dalam fraksi polar daun nyamplung?

3. Bagaimana kondisi yang optimum untuk memisahkan senyawa xanthone dan coumarin?

I.3 Batasan Penelitian

Agar penelitian ini tidak menyimpang dari ketentuan yang digariskan maka diambil batasan dan asumsi sebagai berikut:

1. *Crude extract* daun nyamplung didapatkan dengan menggunakan metode *soxhlet extraction*.
2. *Crude extract* daun nyamplung dipisahkan senyawa polar dan non polarnya menggunakan *Liquid-Liquid Extraction*.
3. Senyawa yang terkandung dalam daun nyamplung diidentifikasi secara kualitatif menggunakan *TLC (Thin Layer Chromatography)* dan *GC-MS (Gas Chromatography–Mass Spectrometry)*, serta secara kuantitatif menggunakan dan Spectrophotometry UV-Vis.
4. Senyawa yang akan diisolasi merupakan senyawa bioaktif.

I.4 Tujuan Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk :

1. Mengetahui senyawa apa saja yang terkandung dalam fraksi polar dan non polar daun nyamplung (*Calophyllum inophyllum*).
2. Mengetahui cara untuk memisahkan senyawa xanthone dan coumarin yang terdapat dalam fraksi polar daun nyamplung.
3. Mengetahui kondisi yang optimum untuk memisahkan senyawa xanthone dan coumarin.

I.5 Manfaat Penelitian

Adapun manfaat dari adanya penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Dapat mendukung masyarakat mengenai manfaat-manfaat tanaman nyamplung, selain bijinya yang dapat digunakan sebagai minyak biodiesel.
2. Dapat mengetahui potensi apa saja yang dapat dikembangkan dari daun nyamplung, terutama fungsi komponen bioaktifnya dalam dunia farmasi.
3. Dapat mengetahui metode yang dapat digunakan untuk memisahkan komponen bioaktif dari daun nyamplung yang dapat digunakan sebagai obat anti kanker dan obat HIV.
4. Dapat memberikan informasi kepada masyarakat mengenai potensi daun nyamplung dalam bidang kesehatan.

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

II.1 Teori Penunjang

II.1.1 Persebaran *Calophyllum inophyllum* (Nyamplung) di Indonesia.

Nama ilmiah dari *Calophyllum inophyllum* diambil dari bahasa Yunani *Kalos*, yang berarti cantik dan *Phullon* yang berarti daun. Di Inggris, pohonnya dikenal sebagai *beautiful leaf* (terjemahan dari bahasa Yunani), *Indian Laurel* (karena berasal dari India), *Alexandrian Laurel*, dan *Beach Calophyllum* (karena pohonnya biasanya tumbuh di tepi pantai). Di Tahiti, pohon ini dinamakan *ati* dan buahnya disebut *tamanu*. Sedangkan di Indonesia, tanaman ini disebut dengan *Nyamplung*. Sedangkan di Hawaii tanaman ini dinamakan *Kamani Tree* dan dikenal dengan sebutan *Foraha Tree* di Madagaskar (Ling, 2009).



Gambar II.1 Persebaran *Calophyllum inophyllum* di Dunia

Menurut Ong et al, 2014 Peta persebaran nyamplung atau *Calophyllum inophyllum* di dunia cukup luas. Spesies ini umumnya ditemukan di daerah yang memiliki iklim tropis. Di dunia, spesies ini terdapat di negara-negara seperti Australia, Cambodia, Pulau Cook, Fiji, French Polynesia, India, Indonesia, Jepang, Kiribati, Laos, Madagaskar, Malaysia, Marshall Islands, Myanmar, New Caledonia, Pulau Norfolk, Papua Nugini, Filipina, Reunion, Samoa, Pulau Solomon, Sri Lanka, Taiwan, Provinsi China, Thailand, Tonga, Vanuatu, dan Vietnam.

Di Indonesia sendiri, tanaman *Calophyllum inophyllum* atau yang biasa disebut tanaman nyamplung tersebar hampir merata di seluruh wilayah Indonesia. Dari peta dibawah ini, dapat diketahui bahwa wilayah persebaran tanaman ini mencakup Sumatera (Sumatera Barat, Riau, Kepulauan Riau, Lampung, dan Kepulauan Bangka Belitung), Jawa (Banten, Jawa Barat, Jawa Tengah Jogjakarta, Jawa Timur), Bali, NTT, NTB, Kalimantan (Kalimantan Barat, Kalimantan Tengah, dan Kalimantan Selatan), Sulawesi (Sulawesi Utara, Gorontalo, Sulawesi Tengah, Sulawesi Selatan, dan Sulawesi Tenggara), Maluku, dan Papua (Sudrajat, 2009).



Gambar II.2 Persebaran *Calophyllum inophyllum* di Indonesia

II.1.2 Karakteristik Tanaman Nyamplung (*Calophyllum inophyllum*)

Tanaman *Calophyllum inophyllum* memiliki berbagai macam nama sebutan yang berbeda-beda di setiap wilayah. Di Indonesia kebanyakan menyebut tanaman ini dengan nama nyamplung. Di Inggris, warga setempat menyebutnya dengan Tamanu. Di Hawaii orang sekita menyebutnya dengan Kamani, dan masih banyak lagi sebutan yang lain (Dweck and Meadows, 2002). Tanaman *Calophyllum inophyllum* atau yang biasa disebut Nyamplung memiliki taksonomi sebagai berikut :

- | | |
|--------------|-------------------------------------|
| Kingdom | : Plantae (tumbuhan) |
| Subkingdom | : Tracheobionta (berpembuluh) |
| Superdivisio | : Spermatophyta (Menghasilkan Biji) |
| Divisio | : Magnoliophyta (berbunga) |

Kelas : Magnoliopsida (dikotil)
 Sub-Kelas : Dilleniidae
 Ordo : Theales
 Familia : Clusiaceae
 Genus : *Calophyllum*
 Spesies : *Calophyllum inophyllum* Linn.

(Heyne, 1987)



Gambar II.3 Bagian-bagian Tanaman Nyamplung

Nyamplung adalah tanaman yang mudah tumbuh di daerah yang bertanah pasir dan daerah pesisir pantai berudara panas (Wahyuni, et al, 2010). Tumbuhan ini tumbuh di daerah tropis, di sepanjang pantai dan mengelompok (Iskandari, Anna, 2010). Nyamplung juga dapat tumbuh baik pada ketinggian 0-800 mdpl seperti di hutan, pegunungan, dan rawa-rawa (Baity, et al, 2011). Tanaman ini memiliki karakteristik sebagai berikut :

Tabel II.1 Karakteristik Tanaman Nyamplung

Nama Bagian Tanaman	Ciri-ciri
Batang	Berkayu, bulat, dan berwarna coklat atau putih kotor.
Daun	Berwarna hijau, tunggal, bulat memanjang atau bulat telur, ujung tumpul, pangkal membulat, tepi rata, pertulangan bersirip, panjang 10-21 cm, tangkai 1,5-2,5 cm.
Akar	Tunggang, bulat, berwarna coklat.

Tabel II.1 Karakteristik Tanaman Nyamplung (lanjutan)

Nama Bagian Tanaman	Ciri-ciri
Bunga	Majemuk, bentuk tandan, di ketiak daun yang teratas, berkelamin dua, diameter 2-3 cm, daun berkelopak empat, tidak beraturan, benang sari banyak, tangkai putih membengkok, kepala putik bentuk perisai, daun mahkota empat, bentuk perisai.
Buah	Batu, bulat seperti peluru dengan mancung kecil di depannya, diameter 2,3-3,5 cm, berwarna coklat.
Akar	Tunggang, bulat, berwarna coklat.

*Yunitasari et al, 2008

II.1.3 Manfaat dan Kandungan dalam Daun Nyamplung (*Calophyllum inophyllum*)

C. inophyllum merupakan sumber obat-obatan tradisional. Air rendaman daun tumbuhan ini dapat menyejukkan mata dan mengobati mata yang meradang. Benang sari dari bunganya digunakan sebagai jamu bersalin. Bijinya dibuat selai dan digunakan untuk menyembuhkan kudis. Getah dan gelamnya digunakan untuk mengasapi penderita rematik, dan sendi-sendi kaku. Minyak dari biji tumbuhan ini dapat menghilangkan borok kepala dan menyembuhkan penyakit kulit bahkan dapat digunakan untuk menumbuhkan rambut (Heyne,1987).

Pada dunia farmasi, tanaman ini dikenal dapat berfungsi sebagai anti bakteri, anti kanker antineoplastic, anti inflamasi, antiplatelet, antipsikotik, antiviral, Photoprotective, Molluscicidal, dan Piscicidal (Ling et al, 2009). Berikut ini merupakan manfaat tanaman nyamplung yang diperoleh dari beberapa sumber :

Tabel II.2 Manfaat dan Kegunaan Tanaman Nyamplung

Nama Bagian Tanaman	Fungsinya dalam dunia medis		
	Su et al, 2008	Iskandari, Anna, 2010	Ling et al, 2009
Daun	Mengobati ruam kulit, merawat luka bakar, dsb	Menghambat pertumbuhan larva <i>Culex quinquefasciatus</i> dan <i>Aedes aegypti</i> , penghambat virus HIV	Mengobati penyakit kulit, radang sendi, linu panggul, iritasi pada mata
Buah/Biji	Mengobati nyeri lambung, luka bakar, dsb	Menghambat pertumbuhan larva <i>Culex quinquefasciatus</i> , senyawa antimikroba dan agen toksik	Mengobati luka, kusta, penyakit syaraf, luka bakar,
Batang	Mengobati disentri, luka luar, bisul, dsb	Anti bakteri	Mengobati <i>internal haemorrhage</i>
Ranting		Anti virus HIV dan anti-tumor	

Karena seluruh bagian tanaman ini dapat bermanfaat dalam mengobati berbagai macam penyakit, maka sejumlah peneliti telah melakukan penelitian lebih lanjut mengenai kandungan fitokimia dalam tanaman nyamplung ini. Menurut Ling et al, 2009 senyawa yang terkandung didalam tanaman ini diantaranya, Inophynone, Canophyllol, Canophyllic acid, Calophyllolide, Inophyllolide, Inophyllum B, C, P, and E, Jacareubin, (+)- Calanolide A, Inocalophyllins A dan B, Calophynone, Calophyllumin C, Inophyllin A, dan lain-lain. Sementara dari Su et al, 2008 menyebutkan bahwa menurut Cechinel Filho et al. (2009), pada berbagai bagian dari pohon *Calophyllum inophyllum* mengandung komponen bioaktif, termasuk diantaranya adalah: xanthones, coumarins, chromanones (flavonoids, biflavonoids), tripenes, tripenoids dan steroids.

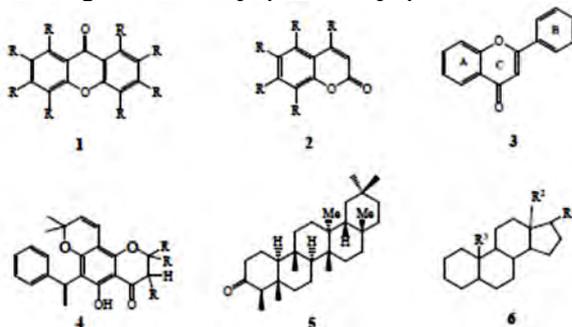
Menurut Ling et al 2009, penelitian lebih lanjut mengenai senyawa coumarin di dalam tanaman ini. Coumarin dalam *Calophyllum inophyllum* mengandung dua komponen, yaitu *Calanolide A* dan *Calanolide B*. Dari penelitian tersebut didapatkan bahwa senyawa coumarin dalam *Calophyllum inophyllum* ini mungkin dapat efektif dalam mengobati penyakit kanker dan menghambat virus HIV.

Menurut Iskandari, A. 2010 dalam karya ilmiahnya, pada ranting terdapat senyawa turunan 4-fenil-coumarin yang merupakan senyawa anti virus HIV dan anti-tumor (Itoigawa et al., 2001). Ekstrak daun dan biji dari tumbuhan ini mampu menghambat pertumbuhan dari larva *Culex quinquefasciatus*, *Anopheles stephensi* dan *Aedes aegypti* (Muthukrishnan et al., 2001). Selain itu ekstrak buah dan kulit akar dari tumbuhan ini merupakan senyawa antimikroba dan agen toksik. Senyawa-senyawa yang diisolasi dari akar, merupakan agen antibakteri (Yimdjo et al., 2004). Senyawa diisolasi dari daun *C. inophyllum* diketahui mempunyai aktivitas sebagai penghambat virus HIV (Patil et al., 1993)

Menurut Lim, T. K. 2012, dalam bukunya menurut Li et al, 2007, sedikitnya sembilan komponen telah di isolasi dari daun *Calophyllum inophyllum*, diantaranya: 2-hydroxyxanthone; 4-hydroxyxanthone; 1,5-dihydroxyxanthone; 1,7-dihydroxyxanthone; 1,3,5-trihydroxy-2-methoxyxanthone; 6-deojacaeubin; flavonoids, amentoflavone; kaempferol-3-O- α -L-rhamnoside; and quercetin-3-O- α -L-rhamnoside.

Dari ketiga penelitian mengenai daun, terdapat beberapa perbedaan sekaligus persamaan yang didapat dari hasil analisa kandungan daun *Calophyllum inophyllum*. Beberapa senyawa yang sama yang telah di isolasi dari tumbuhan *Calophyllum inophyllum* cukup beragam, diantaranya senyawa turunan xanthone (1) (Yimdjo et al, 2004; linuma et al, 1994), coumarin (2) (Su et al, 2008), flavonoid (3) (linuma, 1994), benzodipiranon (4) (Khan et al, 1996), Triterpenoid (5) (Yimdjo et al, 2004; Kumar et al, 1976) dan steroid (6) (Su et al, 2008). Dibawah ini

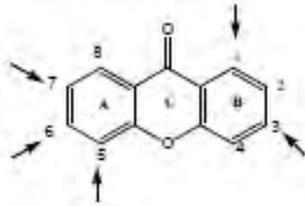
akan dijelaskan secara singkat mengenai komponen-komponen yang terkandung dalam *Calophyllum inophyllum*.



Gambar II.4 Komponen yang Terkandung dalam Nyamplung

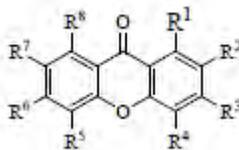
1) Xanthone

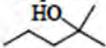
Xanthone merupakan senyawa dengan kerangka dasarnya dua fenil yang dihubungkan dengan jembatan karbonil dan oksigen (eter). Xanthone mempunyai kerangka dasar yang terdiri atas 13 atom karbon yang membentuk susunan C6-C1-C6. Biosintesis senyawa xanthone belum diketahui secara jelas namun diduga masih berhubungan dekat dengan biosintesis senyawa flavonoid dan stilbenoid. Hal ini bisa dilihat dari tipe oksigenasi dua jenis cincin aromatik yaitu satu cincin aromatik (A) memperlihatkan ciri berasal dari jalur sikimat dan satu cincin (B) lagi memperlihatkan ciri berasal dari jalur asetat-malonat. Senyawa xanthone yang di isolasi dari tumbuhan *Calophyllum inophyllum* ada yang terprenilasi dan ada juga yang tidak terprenilasi. Kebanyakan senyawa xanthone yang diisolasi dari tumbuhan ini menunjukkan adanya ciri khas, salah satunya adalah gugus hidroksi pada C1. Kemungkinan posisi oksigenasi ditunjukkan pada gambar berikut ini.

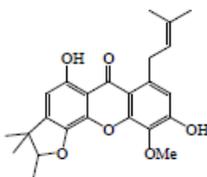


Gambar II.5 Kemungkinan Posisi Oksigenasi Xanthone

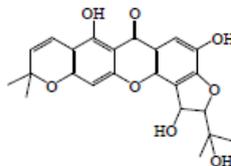
Senyawa xanthone dari kulit akar *C. inophyllum* antara lain: 1,5 dihidroksiksanton (**7**), caloksanton A (**22**), 3-hidroksiblcoksantona (**23**), caloksantona B (**10**) (Yimdjo *et al.*, 2004; Inuma *et al.*, 1994), caloksantona E (**8**), 1,2,8-trihidroksi-7-metoksiksantona (**9**), 1,3-dihidroksi-7,8-metoksiksantona (**20**), 6-hidroksi-1,5-dimetoksiksantona (**11**), 1,3,5-trihidroksi-2-metoksiksantona (**12**), caloksantona D (**21**) (Inuma *et al.*, 1995), dan caloksantona C (**24**) (Hay *et al.*, 2004; Inuma *et al.*, 1994). Senyawa xanthone yang diisolasi dari kayu bagian dalam *C. inophyllum* antara lain 1,7-dihidroksiksantona (**13**), 1,5,6-trihidroksiksantona (**14**), 1,6-dihidroksi-5-metoksiksantona (**15**) (Jebouri *et al.*, 1971), 2-(3,3dimetilalil)-1,3,5 trihidroksiksantona (**16**) (Jebouri *et al.*, 1971; Goh *et al.*, 1991), dan 1,3,5,6-tetrahidroksi-2-(3-hidroksi-3-metilbutil)ksanton (**17**) (Goh *et al.*, 1991). Senyawa xanthone yang diisolasi dari kayu *C. inophyllum* antara lain: 1,7 dihidroksi-3,6-dimetoksiksantona (**18**), 6-(3',3'-dimetilalil)hidroksiksanton (**19**), jacareubin (**25**), dan 6-dehidroksijacareubin (**26**) (Kumar *et al.*, 1976).



	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	R ⁶	R ⁷	R ⁸
7	H	H	H	OH	H	H	H	OH
8	OH	H	OH	H	OH	OH	MeO	H
9	OH	H	OH	H	H	H	MeO	OH
10	OH	H	OH	H	H	H	MeO	MeO
11	MeO	H	H	H	MeO	OH	H	H
12	OH	MeO	OH	H	OH	H	H	H
13	OH	H	H	H	H	H	OH	H
14	OH	H	H	H	OH	OH	H	H
15	OH	H	H	H	MeO	HO	H	H
16	OH	Isoprenil	OH	H	OH	H	H	H
17	OH		OH	H	OH	OH	H	H
18	OH	H	MeO	H	H	MeO	OH	H
19	OH	H	H	H	OH	Isoprenil	H	H



20



21

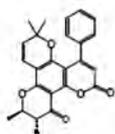
Gambar II.6 Senyawa Xanthone dari Kulit Akar *C. inophyllum*

2) Coumarin

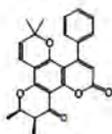
Senyawa bahan alam yang juga banyak diisolasi dari tumbuhan *Calophyllum inophyllum* adalah golongan coumarin. Biosintesis senyawa coumarin berasal dari jalur sikimat, atau masih sejalar dengan golongan fenil propanoid. Dari segi biogenetik, kerangka benzopiran-2-on dari coumarin berasal dari asam-asam sinamat melalui orto-hidrolaksi. Asam orto-kumarat yang dihasilkan setelah menjalani isomerisasi cis-trans mengalami kondensasi (Lenny, 2006). Ciri khas senyawa ini adalah adanya gugus lakton yang terbentuk dari asam pada ujung gugus propan dengan hidroksi pada gugus fenil. Oksigenasi senyawa coumarin pada cincin aromatikanya juga khas, yaitu berselang-seling. Struktur senyawa

turunan coumarin dilihat dari gugus yang terikat pada C4 dapat dibedakan menjadi 4-metilcoumarin, 4-fenilcoumarin, dan 4-(n-propil) coumarin. Diantara ketiganya senyawa coumarin dengan gugus fenil dan n-propil pada C4 merupakan senyawa yang terbanyak ditemukan.

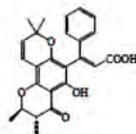
Senyawa coumarin yang telah diisolasi dari bagian daun *C. Inophyllum* antara lain: inophyllum C (27), inophyllum E (28) (Patil *et al.*, 1993; Hawazu *et al.*, 1968), inophyllum A (30), inophyllum B (31), inophyllum P (32), inophyllum D (33), asam calophylllic (29), asam isocalophylllic (34), inophyllum G-1 (35), dan inophyllum G-2 (36) (Patil *et al.*, 1993). Pada bagian biji *C. inophyllum* juga telah dilakukan isolasi golongan senyawa coumarin, antara lain: inophyllum C (27), inophyllum E (28), inophyllum B (31) (Spino *et al.*, 1998), inocalophyllin A (37), inocalophyllin A metil ester (38), inocalophyllin B (39), inocalophyllin B metil ester (40) (Shen *et al.*, 2003 dalam Su, *et al.*, 2008). Coumarin juga diisolasi dari *aerial part C. inophyllum*. Senyawa yang diisolasi dari bagian ini antara lain: calocoumarin A (41), calocoumarin B (42), calocoumarin C (43) (Ito, *et al.*, 2003).



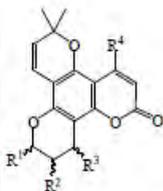
27



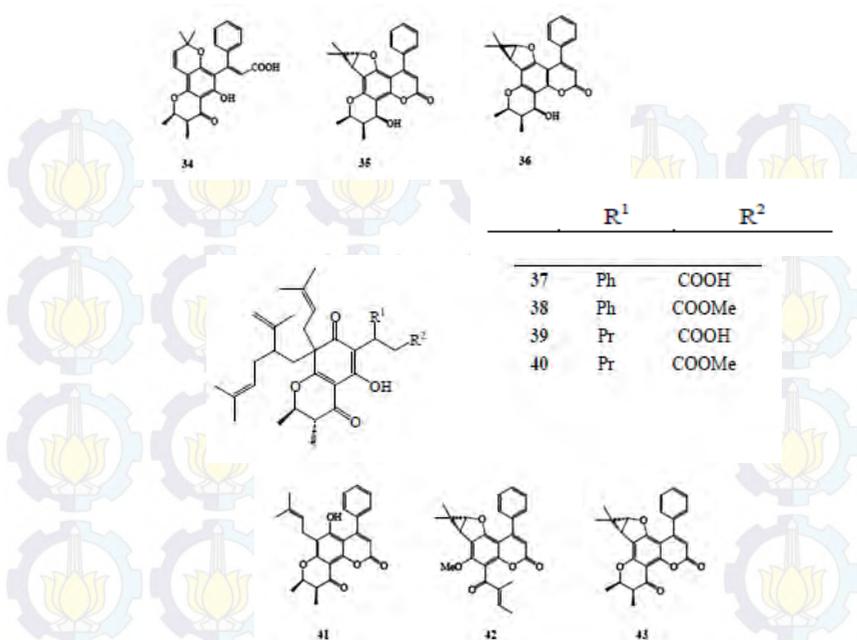
28



29



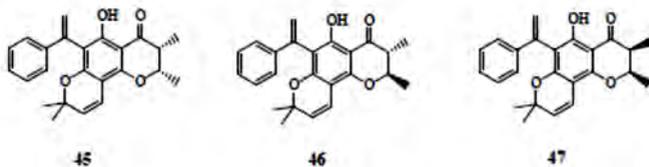
	R ¹	R ²	R ³	R ⁴
30	β- Me	β- Me	β- OH	Ph
31	β- Me	α- Me	β- OH	Ph
32	β- Me	α- Me	α- OH	Ph
33	β- Me	β- Me	α- OH	Ph



Gambar II.7 Senyawa Coumarin dari Daun *C. inophyllum*

3) Benzodipiranon

Benzodipiranon merupakan senyawa turunan dari kromanon. Senyawa-senyawa ini memiliki kerangka yang mirip dengan stilben dengan tambahan dua gugus prenil. Senyawa benzodipiranon dari tumbuhan *C. inophyllum* diisolasi dari bagian daun. Senyawa-senyawa tersebut adalah (2*S*,3*R*)-2,3-dihidro-5-hidroksi-2,3,8,8-tetrametil-6-(1-feniletetil)-4*H*,8*H*-benzo[1,2-*b*:3,4-*b'*]dipiran-4-on (**44**) (Khan, *et al.*, 1996), (2*R*,3*R*)-2,3-dihidro-5-hidroksi-2,3,8,8-tetrametil-6-(1-feniletetil)-4*H*,8*H*-benzo[1,2-*b*:3,4-*b'*]dipiran-4-on (**45**) (Khan *et al.*, 1996; Ali *et al.*, 1999), dan isoinophynone (**46**) (Ali *et al.*, 1999).

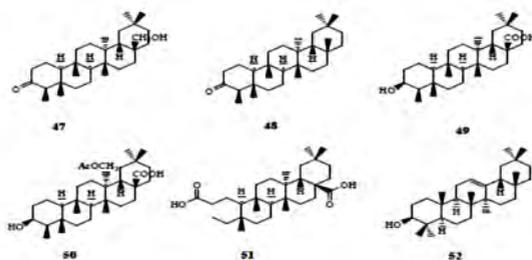


Gambar II.8 Senyawa Benzodipironon dari Daun *C. Inophyllum*

4) Triterpenoid

Triterpenoid merupakan golongan senyawa terpenoid yang terdiri dari 30 atom C atau 6 unit isopren. Triterpenoid dalam jaringan tumbuhan dapat dijumpai dalam bentuk bebasnya, tetapi juga banyak dijumpai dalam bentuk glikosidanya. Triterpenoid terbagi dalam struktur siklik dan asiklik. Triterpenoid asiklik yang penting hanya squalene yang dianggap sebagai senyawa antara dalam biosintesis steroid. Triterpenoid yang paling tersebar luas adalah triterpenoid pentasiklik. Kerangka yang paling banyak dijumpai pada senyawa golongan triterpenoid adalah ursam, lupan, oleanan, dan friedelin (Kristanti dkk, 2008).

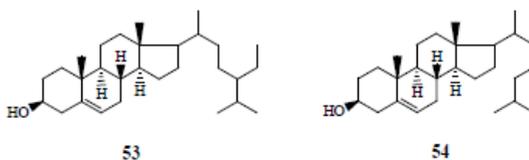
Senyawa triterpenoid yang diisolasi dari daun *C. inophyllum* antara lain: canophyllol (**47**), friedelin (**48**), asam canophyllic (**49**) (Ali *et al.*, 1999; Govindanchari *et al.*, 1967), 27-hidroksiasetat asam canophyllic (**50**), dan asam 3,4- secofriedelane-3,28-dioic (**51**) (Laure *et al.*, 2005 dalam su *et al.*, 2005)). Friedelin juga diisolasi dari kulit akar *C. inophyllum* (Yimdjo *et al.*, 2004). Hasil isolasi dari bagian kayu mendapatkan senyawa β -amyirin (**52**) (Kumar *et al.*, 1976).



Gambar II.9 Senyawa Triterpenoid dari Daun *C. Inophyllum*

5) Steroid

Steroid ditemukan pada *Calophyllum inophyllum* adalah sitosterol (**53**) (Kumar, et al 1976; Goh et al, 1991) dan kolesterol (**54**) (Ali et al, 1962). Sterol adalah steroid yang memiliki gugus hidroksi pada C3nya. Sterol dijumpai dalam bentuk bebas ataupun bergabung dengan glukosa membentuk glikosida (sterolin) atau sebagai ester asam lemak. Sterol merupakan senyawa bahan alam yang umumnya tersusun dari 27 atom karbon (Kristianti dkk, 2008).



Gambar II.10 Rumus Bangun Sitosterol dan Kolesterol

6) Flavonoid

Flavonoid mempunyai kerangka dasar yang terdiri dari 15 atom karbon, dimana rantai benzene (C_6) terikat pada suatu rantai propana (C_3) sehingga membentuk susunan $C_6-C_3-C_6$. Golongan terbesar dari flavonoid adalah flavon. Senyawa flavon memiliki kerangka 2-fenil kroman dimana posisi orto dari cincin A dan atom karbon yang terikat pada cincin B dari 1,3 dialilpropana

dihubungkan oleh jembatan oksigen sehingga membentuk cincin heterosiklik yang baru (Lenny, 2006).

II.1.4 Metode Mendapatkan Ekstrak Daun Nyamplung

Senyawa polar adalah suatu senyawa yang terbentuk akibat satu atom mempunyai keelektronegatifan yang substansial lebih besar daripada yang lain. Semakin elektronegatif suatu atom, semakin besar tarikannya terhadap ikatan elektron. Hasilnya adalah suatu ikatan dengan distribusi rapat elektron yang tak merata. Senyawa non polar adalah suatu senyawa yang terbentuk akibat atom dengan keelektronegatifan yang sama atau hampir sama membentuk ikatan kovalen, dimana kedua atom menerapkan tarikan yang sama atau hampir sama terhadap elektron ikatan. Umumnya, ikatan karbon-karbon dan ikatan karbon-hidrogen adalah jenis ikatan nonpolar yang paling umum (Fessenden, R.J., 1986)

Untuk mengidentifikasi kandungan senyawa polar dan non polar dari daun nyamplung, hal yang perlu dilakukan pertama kali adalah memisahkan antara kandungan polar dan non polarnya. Pemisahan ini berdasarkan *solvent* yang digunakan.

Pemilihan *solvent* tersebut berdasarkan *polarity index*. Air merupakan *solvent* polar dengan *polarity index* sebesar 9. Sedangkan metanol merupakan senyawa agak polar dengan *polarity index* sebesar 5,1. Untuk n-heksana/*petroleum eter* merupakan senyawa non polar dengan *polarity index* sebesar 0 (Sadek, 2002). Dengan dua sifat polaritas yang berbeda diharapkan senyawa polar yang terkandung dalam daun nyamplung akan terlarut pada *solvent* polar begitu pun sebaliknya. Polar atau non polar suatu senyawa dapat dilihat pada tabel II.3.

Tabel II.3 Polaritas *Solvent* (Sadek, P. 2002)

Relative Polarity	Formula	Group	Solvents
 Non polar	R-H	Alkanes	Petroleum ethers, hexanes, ligroin
	Ar-H	Aromatics	Toluene
	R-O-R	Ethers	Diethyl ether
	R-X	Alkyl halides	Trichloromethane, chloroform
	R-COOR	Esters	Ethyl acetate
	R-CO-R	Aldehydes, Ketones	Acetone, MEK
	R-NH ₂	Amines	Phyridine, triethylamine
	R-OH	Alcohols	MeOH, EtOH, IPA, Butanol
	R-COHN ₂	Amides	Dimethylformamide
	R-COOH	Carboxylic Acid	Ethanoic acid
	Polar	H-O-H	Water

Ekstraksi adalah proses pemisahan suatu atau beberapa zat dari suatu padatan atau cairan dengan bantuan pelarut. Pelarut tidak atau hanya sebagian larut dengan padatan atau cairan dengan kontak secara terus menerus agen aktif berpindah dari campuran padatan/cairan (*raffinate*) menuju pelarut (*extract*). Setelah pencampuran dua fase, proses pemisahan dilakukan dengan prinsip gravitasi atau dengan gaya sentrifugal (Gamse, T.,2004).

Yunitasari, E. P., (2008) dalam penelitiannya menjelaskan tentang pengaruh jenis solvent pada berbagai variasi jumlah tray dari 6-10 untuk pengambilan minyak nyamplung dengan metode ekstraksi kolom. Dari hasil percobaan, penulis menjelaskan bahwa semakin banyak jumlah tray maka semakin cepat waktu yang dibutuhkan solvent untuk mengekstrak minyak. Pelarut yang digunakan adalah antara n-Hexane dan n-Petroleum. Dari hasil percobaan, penulis menjelaskan bahwa kondisi maksimum ekstraksi dicapai n-Petroleum pada tray ketujuh, kemudian pada tray selanjutnya semakin menurun jumlah minyak

yang diperoleh. Sedangkan untuk n-Hexane, minyak yang diperoleh terus meningkat di setiap kenaikan tray.

Tabel II.4 Kondisi Operasi untuk Berbagai Macam Proses Ekstraksi

	Modified Soxhlet Extraction	Ekstraksi Soxhlet	Maserasi	Pressurized Liquid Extraction
Pelarut Umum yang Digunakan	Heksana, Ethyl acetate	Methanol, ethanol, atau campuran etanol-air	Methanol, ethanol, atau campuran etanol-air	CO ₂ , Alkohol, Dichloromethane -acetone
Temperatur (°C)	Dipanaskan	Tergantung pelarut yang digunakan	Dapat dipanaskan	Dipanaskan

Tabel II.4 Kondisi Operasi untuk Berbagai Macam Proses Ekstraksi (lanjutan)

	Modified Soxhlet Extraction	Ekstraksi Soxhlet	Maserasi	Pressurized Liquid Extraction
Penggunaan Tekanan diatas 1 atm	Tidak bisa	Tidak Bisa	Tidak Bisa	Bisa (50-250 bar)
Waktu yang Dibutuhkan	11-12 jam	3 – 18 jam	3-4 hari	5 menit
Volume Pelarut yang Dibutuhkan (ml)	350	150 – 200	Tergantung banyaknya sampel	Dapat mengurangi penggunaan pelarut 30 mL/sampel dibandingkan dengan ekstraksi soxhlet
Referensi	Fabian et al.,2009; Gunawan et al.,2008; Kasim et al.,2009; Gunawan et al.,2013	Yunitasari, E. P., 2008.	Sasidharan et al., 2011.	Saleh, N.M. et al., 2009

II.1.5 Identifikasi dan Karakterisasi

Pemisahan untuk identifikasi dan karakterisasi pada umumnya dibagi menjadi dua macam yaitu metode kromatografi dan metode non-kromatografi. Kromatografi sendiri merupakan suatu metode pemisahan komponen-komponen dari sampel dimana terdistribusi dalam dua fase, yaitu fase diam dan fase gerak. Fase diam dapat berupa solid atau liquid, biasanya dalam bentuk solid atau gel. Sedangkan fase gerak dapat berupa packed dalam kolom, tersebar sebagai layer, atau terdistribusi dalam film, dan sebagainya. Fase gerak dapat berupa gas, liquid, atau fluida superkritis. Proses pemisahannya dapat berupa adsorpsi, distribusi massa, pertukaran ion, dan lain-lain, atau berdasarkan perbedaan sifat physico-chemical dari molekulnya seperti ukuran, massa, volume, dan lain-lain. (European Pharmacopeia, 2005). Contoh dalam metode kromatografi adalah dengan TLC, GC-MS, dan HPLC. Dalam penelitian ini metode yang digunakan adalah TLC dan GC-MS. Sedangkan metode non-kromatografi mencakup immunoassay yang menggunakan antibodi monoclonal (MABs), *phytochemical screening assay*, *Fourier-transform infrared spectroscopy* (FTIR), dan *Spectrophotometry* UV-Vis.

II.1.5.1 Metode Kromatografi

II.1.5.1.1 *Thin Layer Chromatography* (TLC)

TLC atau (*Thin Layer Chromatography*) merupakan suatu metode untuk menganalisa campuran dengan memisahkan senyawa-senyawa dalam campuran. TLC dapat digunakan untuk membantu menentukan jumlah komponen dalam suatu campuran, mengidentifikasi senyawa dan kemurnian suatu senyawa. TLC memiliki fase gerak dan fase diam. Fase geraknya berupa liquid, sedangkan untuk fase diamnya biasanya berupa silika atau alumina. Silika dan alumina ini merupakan adsorbent inert yang lapisannya sangat polar.

Tabel II.5 Adsorben dan Aplikasinya

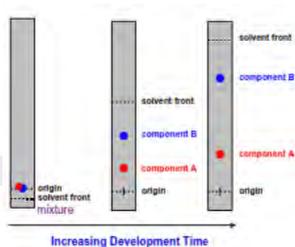
Adsorben	Kekuatan	Aplikasi
Silika Gel	Kuat	Steroids, asam amino, lipid
Charcoal	Kuat	Peptida, karbohidrat

Tabel II.5 Adsorben dan Aplikasinya (lanjutan)

Adsorben	Kekuatan	Aplikasi
Alumunium Oksida	Kuat	Steroid, ester, m alkaloid
Magnesium Karbonat	Medium	Porphyrins
Kalsium Phosphat	Medium	Protein, polynucleotides
Selulosa	Lemah	Protein

(www.phys.sinica.edu.)

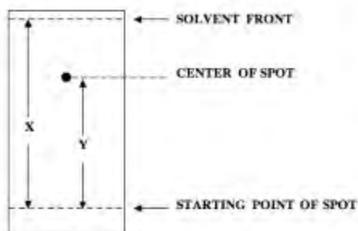
TLC terdiri atas tiga langkah yaitu *spotting*, *development*, dan *visualization*. Pada *spotting*, sampel akan ditotolkan pada plate TLC dalam jumlah yang kecil dengan menggunakan micropipet. Pada *development*, senyawa-senyawa dalam sampel akan terelusi dengan kecepatan yang tergantung pada sifat senyawa-senyawa tersebut (kemampuan terikan pada fasa diam dan kemampuan larut dalam fasa gerak). Senyawa non polar akan lebih sedikit tertarik pada plate sehingga akan menghabiskan waktu yang lebih banyak pada fase gerak. Senyawa ini akan bergerak lebih cepat dan muncul lebih dekat dengan puncak dari plate. Sedangkan senyawa polar akan lebih tertarik pada plate sehingga akan menghabiskan waktu lebih sedikit pada fase gerak dan akan muncul lebih rendah pada plate. Pada visualisasi, spot-spot dapat secara langsung diamat setelah proses development. Namun karena pada umumnya suatu senyawa tidak berwarna, metode visualisasi dibutuhkan. Misalnya pada silika gel dalam plate TLC yang akan menampilkan dark spot dibawah sinar ultraviolet atau dengan menempatkan plate pada iodine vapor dalam beberapa menit. Senyawa-senyawa organik pada umumnya akan membentuk warna gelap kompleks dengan iodine.



Gambar II.11 Penggambaran Skema TLC dengan Campuran Dua Komponen

Pada Gambar II.11 diatas dapat dilihat bahwa semakin berjalannya waktu, komponen A dan Komponen B akan terpisah. Solvent terus bergerak menuju atas dengan prinsip kapilaritas. Komponen B merupakan senyawa yang kurang polar dibandingkan komponen A karena lebih dekat dengan puncak plate. Sedangkan komponen A merupakan senyawa yang lebih polar.

Analisis suatu senyawa dalam TLC biasanya dilakukan dengan dibandingkan terhadap senyawa standarnya. Nilai R_f (*Retardation factor*) digunakan untuk mengkuantitaskan perpindahan dari suatu material sepanjang plate. R_f sebanding dengan jarak yang berpindah dari suatu substansi dibagi dengan jarak yang berpindah dari suatu solvent. Biasanya nilainya diantara nol dan satu. Umumnya efektif solvent memiliki nilai R_f antara 0,3-0,7. Secara ideal, nilai R_f akan sama dari senyawa yang diberikan dengan menggunakan pelarut yang sama. Secara praktis, perpindahan berdasarkan dari struktur dan ketebalan dari layer, jumlah air tersisa, dan efek dari binding agents.



Gambar II.12 $R_f = Y/X$ (selalu ≤ 1)

Thin Layer Chromatography (TLC) ini adalah analisa kualitatif. Keuntungan dengan menggunakan metode TLC adalah mudah, cepat, dan murah. Namun terkadang juga ada masalah dengan metode ini, misalnya adalah sampel tidak muncul yang kemungkinan dapat disebabkan karena sampel tidak cukup atau dibutuhkan metode visualisasi yang berbeda.

Dari penelitian Anna Iskandari, 2010, TLC digunakan untuk menentukan tiap langkah yang dilakukan pada proses kromatografi untuk isolasi senyawa bahan seperti pemilihan sistem eluen dan monitoring jumlah komponen yang ada dalam suatu fraksi. TLC juga digunakan untuk memonitoring kemurnian dari suatu senyawa. Senyawa tunggal tersebut dimonitoring dengan uji TLC menggunakan variasi eluen, jika spot dari beberapa elusi tetap satu, maka senyawa diduga murni. Pada penelitian ini digunakan plat silika yang spesifik untuk senyawa aromatik yaitu plat silika GF₂₅₄. Reagen penyemprot yang digunakan adalah reagen umum untuk mendeteksi adanya senyawa aromatik, yaitu Ce(SO₄)₂. Senyawa yang diduga murni ini dielusidasi dengan spektrofometri IR, UV, H NMR, C NMR, C NMR DEPT 90 dan NMR dua dimensi.

Praveena, dkk (2013) menggunakan analisa TLC untuk mengetahui senyawa yang ada pada ekstrak metanol-daun *Calophyllum inophyllum* pada pelarut yang berbeda baik pada fase normal dan balik. TLC ini dilakukan dengan prosedur standar untuk mendeteksi *phytochemical*, memonitoring progres dari kromatografi kolom, dan mengetes homogenitas dari bahan yang terisolasi. Plat yang digunakan untuk fase normal dan balik adalah plat silika gel 60 F254 (Mercks, Germany) yang digunakan untuk fase diam. Pendeteksian *phytochemical* pada plate TLC setelah observasi terlebih dahulu pada siang hari, kemudian dibawah sinar UV, dan dispray dengan reagen vanilin-sulphuric acid (VS). VS reagen tersebut mengandung 5% larutan methanol dari asam sulfat (larutan 1) dan 1% larutan methanol dari vanilin (larutan 2). Pertama, plat disemprot dengan larutan 1 untuk membasahinya, diikuti dengan larutan 2, dan kemudian dipanaskan 3-4 menit pada suhu 110°C dibawah pengawasan.

Steroid/triterpenoid dan glycoside akan memberikan spot berwarna biru, biru-violet, pink dan warna kuning dari flavonoid.

II.1.5.1.2 Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS)

GC-MS merupakan metode pemisahan senyawa organik yang menggunakan dua metode analisis senyawa yaitu kromatografi gas (GC) untuk menganalisa jumlah senyawa secara kuantitatif dan spektrometri massa (MS) untuk menganalisis struktur molekul senyawa analit. Gas Chromatography (GC) menggunakan carrier gas untuk membawa komponen sampel melewati packed column atau kolom kapiler yang mengandung fase diam. Gas pembawa yang dipilih biasanya adalah gas inert contohnya Helium yang bisa digunakan juga untuk deteksi MS. Fasa diam yang digunakan bisa dalam bentuk solid atau immobilised polymeric liquid.

Prinsip pemisahan campuran dari GC berdasarkan perbedaan kecepatan migrasi komponen-komponen penyusunnya. Ketika fase gerak membawa sampel melewati fase diam, sebagian komponen sampel akan menempel ke fase diam dan bergerak lebih lama dari komponen lain sehingga masing-masing komponen akan keluar kolom dengan waktu yang berbeda (*retention time*). Pada GC, jika spektra mengandung banyak senyawa, maka semakin banyak pula peak yang terbentuk. Berdasarkan data waktu retensi yang sudah diketahui dari literatur, bisa diketahui senyawa apa saja yang ada dalam sampel.

Mass spectrometer (MS) merupakan suatu instrumen yang didesain untuk memisahkan ion-ion fase gas berdasarkan nilai *mass to charge ratio* (m/z). MS memasukkan pemisahan dari *charged species* yang dihasilkan berdasarkan variasi dari metode ionisasi, umumnya yang digunakan adalah Electron Impact (EI) dan Chemical Ionisation (CI). Pemisahan dari fase ion dapat diperoleh dengan MS menggunakan bidang elektrik atau magnetik yang akan membedakan ion. Pada ionisasi EI dimana molekul analit diionisasi secara langsung melewati *collision* dengan membombardir aliran elektron sehingga menghasilkan penghilangan elektron untuk membentuk spesies kation radikal.

Pada CI molekul analit diionisasi melalui proses reaksi dengan mencharge reagen gas plasma menghasilkan baik spesies anion atau kation berdasarkan kepolaran analit atau analiser.

Malarvizhi dan Ramakrishnan (2011) menggunakan analisa GC-MS untuk mengetahui senyawa bioaktif dari daun *Calophyllum inophyllum*. Hasil dari pembacaan GC-MS terdapat 17 senyawa teridentifikasi. Dari 17 senyawa yang terisolasi, terdapat empat phytochemical yang terekam diatas 10% dari level peak area, yaitu *squalene* (10,74%), 1-monolinoleoylglycerol trimethylsilyl ether (11,80%), Androstan-1 α -01-17- one, 2,3, isopropylidenedioxy - 4 β - methyl- (21,63%), 1-2- Benzene dicarboxylic acid, di isooctyl ester (28,11%). Dimana cyclohexene muncul pertama kali dari kolom dengan retention time 10,83 menit.

II.1.5.1.3 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

HPLC adalah suatu metode analisa yang memiliki performa tinggi dan kecepatan tinggi dibandingkan dengan tradisional kolom kromatografi karena fase gerak secara paksa dipompakan. HPLC merupakan analisa yang kualitatif dan kuantitatif.

Sistem HPLC terdiri atas pumping unit, sample-injection unit, separation unit, detection unit, dan data processing unit. Pada pumping unit ini, pelarut (*eluent*) dipompakan secara konstan flowrate dan pressure. Komposisi pelarut ini harus tetap konstan selama analisa. Pada sample-injection unit, sampel diinjeksikan mengikuti arah aliran untuk analisa. Terdapat manual injector dan autosampler. Setiap tipe mengandung enam port valve, sehingga sampel dapat diinjeksikan dengan tekanan kontinu. Pada separation unit, kolom dipilih yang cocok baik untuk sampel atau tujuan pemisahan. Kolom oven sering digunakan untuk menjaga kolom pada konstan suhu. Jika suhu kolom berubah selama analisa kualitatif atau kuantitatif, waktu elusi dari komponen akan berubah sehingga menyebabkan analisis kurang akurat. Umumnya suhu analisa yang dipilih antara 25-50⁰C. Pada detection unit, komponen yang terelusi dari kolom

terdeteksi, dan data yang terdeteksi diubah menjadi sinyal elektrik. Pemilihan detektor berdasarkan sampel yang cocok. Contohnya adalah UV detector yang biasanya mendeteksi komponen yang memiliki panjang gelombang absorpsi dari 400 nm atau kurang dari wilayah ultraviolet. Pada data-processing unit, konsentrasi tiap komponen yang terdeteksi dihitung berdasarkan area atau tinggi peak. Area atau tinggi peak tersebut menunjukkan waktu retensi dimana waktu retensi adalah waktu yang dibutuhkan oleh senyawa untuk bergerak melalui kolom menuju detektor. Waktu retensi diukur berdasarkan waktu dimana sampel diinjeksikan sampai sampel menunjukkan keteinggian puncak yang maksimum dari senyawa tersebut.

Ada dua tipe dari HPLC, yaitu normal phase dan reverse phase. Kolom pada fase normal HPLC diisi dengan partikel silika yang sangat kecil dan pelarut non polar misalnya heksan. Senyawa-senyawa polar dalam campuran melalui kolom akan melekat lebih lama pada silika yang polar dibanding dengan senyawa-senyawa non polar. Oleh karena itu, senyawa yang non polar kemudian akan lebih cepat melewati kolom. Sedangkan pada reverse phase, kolom memiliki ukuran yang sama namun silika dimodifikasi menjadi non polar melalui pelekatan rantairantai hidrokarbon panjang pada permukaannya secara sederhana baik berupa atom karbon 8 atau 18. Pelarut polar yang digunakan berupa campuran air dan alkohol seperti metanol. Air mengandung buffer atau garam untuk membantu dalam pemisahan komponen analit. Reverse phase HPLC ini merupakan bentuk yang biasa digunakan dalam HPLC.

Praveena ch (2013) selain menggunakan metode TLC untuk analisa, juga menggunakan HPLC untuk memperkuatnya. Kolom analisa menggunakan reverse phase C-18 dengan mobile phase methanol:air (90:10). Kromatografi dilakukan pada flowrate 1 ml/menit pada suhu ruangan. Pada percobaan ini, dibagi menjadi 3 kode CI-1, CI-2, dan CI-3 sesuai dengan fraksi yang memunculkan single spot pada fase normal analisa TLC dengan nilai R_f yang sama. Pada CI-1 diperoleh nilai λ_{max} dari 203 nm dan 273 nm. Senyawa dari IR spectrum mengindikasikan

adanya gugus fungsi hidroksil, methylene, dan karbonil. Senyawa dengan NMR spektra memiliki peak pada 7,25 ppm, mengindikasikan terdapat proton aromatic, dua singlets muncul pada 0,805 dan 0,898 disinyalir adalah metil proton, doublet muncul pada 1,44 disinyalir proton methylene. Pada CI-2 nilai $\lambda_{\max} = 204 \text{ nm}$. Senyawa dari IR spectrum mengindikasikan adanya gugus fungsi hidroksil dan karbonil. Senyawa dengan NMR spektra memiliki peak pada 7,26 ppm, mengindikasikan terdapat proton aromatic, dua singlets muncul pada 0,821 dan 0,88 disinyalir adalah metil proton, peak muncul pada range 5,373 dan 6,463 disinyalir proton alkene. Perbandingan data NMR senyawa CI-2 dan penelitian sebelumnya untuk proton dari spektra H NMR dan gugus fungsi, data peak dari C_{13} NMR mengindikasikan senyawa kemungkinan adalah coumarin dan *calophyllic acid*. Pada CI-3 nilai $\lambda_{\max} = 211 \text{ nm}$. Senyawa dari IR spectrum mengindikasikan adanya gugus fungsi hidroksil, methylene dan karbonil. Senyawa dengan NMR spektra memiliki peak pada 7,32 ppm, mengindikasikan terdapat proton aromatic, dua doublets muncul pada 1,46 disinyalir methylene proton.

II.1.5.2 Metode Non-Kromatografi

II.1.5.2.1 Immunoassay

Immunoassay, metode yang menggunakan antibodi monoclonal melawan obat dan senyawa bioaktif dengan berat molekul rendah, telah menjadi alat yang penting dalam analisa senyawa bioaktif. Metode ini menunjukkan spesifiktas dan sensitifitas untuk analisa *receptor binding*, assay dan kualitas enzim termasuk dalam teknik kuantitative analitik. *Enzyme-linked immunoabsorbent assay* (ELISA) bergantung pada MAbs dalam banyak kasus lebih sensitive dari metode HPLC konvensional. MAbs dapat dibuat dalam sel khusus melalui teknik yang disebut teknologi hybridoma.

II.1.5.2.2 Phytochemical Screening Assay

Phytochemical adalah senyawa kimia yang diambil dari tanaman dan istilah ini seringkali digunakan untuk

mendesripsikan sebagian besar dari senyawa metabolis sekunder yang ditemukan dalam tumbuhan. *Phytochemical Screening Assay* adalah prosedur yang sederhana, cepat dan murah yang memberikan tipe-tipe *phytochemical* yang ada dalam campuran. Setelah mendapatkan ekstrak atau fraksi aktif dari tumbuhan, *phytochemical screening* dapat dilakukan untuk mendapatkan senyawa *phytochemical* apa saja yang ada dalam campuran atau fraksi.

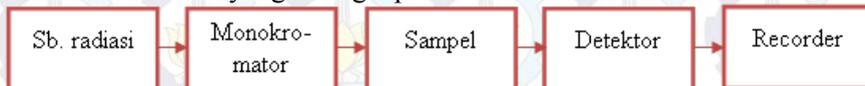
II.1.5.2.3 Fourier-transform Infrared Spectroscopy (FTIR)

FTIR telah terbukti sebagai salah satu alat yang berharga untuk karakterisasi dan identifikasi senyawa atau gugus fungsional yang ada dalam campuran ekstrak tanaman. Spektrum FTIR dari senyawa murni biasanya sangat unik sehingga bisa dianggap sebagai “sidik jari” molekul. Untuk senyawa tumbuhan yang paling umum, spectrum sebuah komponen yang tidak diketahui dapat dicari dari perbandingan dengan spectrum dari senyawa yang diketahui. Sampel FTIR dapat disiapkan dalam beberapa cara. Untuk sampel liquid, cara yang termudah adalah untuk menempatkan satu tetes sampel diantara dua pelat *sodium chloride*. Tetesan akan membentuk film tipis diantara pelat. Sampel solid dimill dengan KBr dan dikompres menjadi *pellet* tipis yang dapat dianalisa. Cara lainnya adalah sampel solid dilarutkan dalam pelarut seperti *methylene chloride*, dan larutan diletakkan ke atas sebuah pelat garam. Pelarut kemudian diuapkan, sehingga akan tersisa film tipis material awal di atas pelat.

II.1.5.2.4 Spectrophotometer UV-Vis

Spektrofotometer UV-VIS merupakan alat analisis sampel dengan menggunakan prinsip-prinsip absorpsi radiasi gelombang elektromagnetik oleh bahan untuk panjang gelombang sinar UV sampai dengan sinar tampak. Kegunaan dari alat ini adalah untuk menentukan kandungan zat organik/anorganik dalam suatu sampel larutan.

Beberapa komponen spektrofotometer yang penting yaitu: sumber energy radiasi yang stabil, monokromator (celah, lensa, atau cermin), wadah sampel transparan (kuvet), dan detector radiasi yang dilengkapi oleh recorder.



Gambar II.13 Skema Susunan Spektrofotometer UV-VIS

II.2. Studi Hasil Penelitian Sebelumnya

Penelitian-penelitian tentang daun nyamplung (*Calophyllum inophyllum*) yang telah dilakukan antara lain :

1. Marie C. Yimdjo et. al. (2004)

melakukan penelitian tentang *Antimicrobial and Cytotoxic Agent from Calophyllum inophyllum*. Senyawa yang diisolasi dari jenis nyamplung ini adalah *caloxanthonones A dan B, macluraxanthone, 1,5-dihydroxyxanthone, calophynic acid, brasiliensis acid, friedelan-3-one, calaustralin, calophyllolide, inophyllum C dan E, dan inoxanthone*. Dari penelitian ini didapat bahwa 7 senyawa termasuk *caloxanthonones A, calophynic acid, brasiliensis acid, inophylloidic acid, calophyllolide dan inophyllum C dan E* dapat menghambat *S. aureus* tapi tidak mikroba lainnya. *Calophyllolide* sendiri merupakan satu-satunya senyawa yang menunjukkan efek sitotoksik yang paling signifikan terhadap sel KB. Selain itu ditemukan juga senyawa baru yang disebut *inoxanthone*.

2. Janki Prasad, et. al. (2012)

Melakukan penelitian tentang *Antislipidemic dan aktifitas antioksidan* dari senyawa yang diisolasi dari daun *Calophyllum inophyllum*. Daun dari *Calophyllum inophyllum* ditumbuk hingga berbentuk serbuk. Serbuk daun di ekstrak dengan 95% ethanol dan dibiarkan pada suhu kamar selama 24 jam. Hasil ekstraksi lalu dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 40⁰ C. Ekstrak ethanol ini kemudian di fraksinasi dengan toluene dan air. Bagian yang larut di dalam toluene

dipisahkan menggunakan corong pemisah dan dipekatkan sedangkan bagian *aqueous* dilarutkan kembali dengan ethyl asetat. Bagian yang larut di ethyl asetat dipisahkan dan dipekatkan menggunakan *rotary evaporator*. Bagian *aqueous* kemudian di fraksinasi dengan n-butanol. Tiap bagian yang larut di masing-masing pelarut dilakukan analisa kromatografi menggunakan *silica gel* sehingga akan didapatkan senyawa bioaktif yang bisa diisolasi. Komponen yang diisolasi adalah *calophyllic acid* dan *isocalophyllic acid*, *canophyllic acid*, *amentoflavone*, dan *shikimic acid*. *Calophyllic acid* dan *isocalophyllic acid*.

3. A.C. Dweck dan T. Meadowsy (2002)

Minyak mengandung 2 komponen bioaktif yaitu *calophyllic acid* dan *lactone* yang memiliki sifat antibiotik. Kulit kayu mengandung tanin dan asam benzoat. Daun mengandung *friedelin* dan *triterpene* dari grup *friedelin* yang disebut *calophyllal*, *calophyllol*, dan *calophyllic acid*. *Xanthone* seperti *mesuxxanthone B* dan *calophyllin B* bisa didapat dari *heartwood*. Tanaman ini mengandung *4-phenylcoumarins* yang memiliki aktifitas sebagai anti tumor. Zat aktif yang terdapat dalam minyak adalah *calophyllolide* ($C_{25}H_{22}O_5$), molekul yang mengandung gugus *lactonic* dan *amethoxyl*, *calophyllic acid* ($C_{25}H_{24}O_6$) yang berasal dari saponifikasi *calophyllolide*. Selain itu, Dweck juga menyebutkan bahwa minyak nyamplung memiliki kandungan resin beracun yang membuat manusia tidak bisa mengkonsumsi minyak tersebut.

4. Frederic Laure, et. al. (2008)

melakukan penelitian tentang *Screening of anti-HIV-1 inophyllums by HPLC-DAD of Calophyllum Inophyllum Leaf Extract from French Polynesia Islands*. Penelitian ini menggunakan HPLC untuk menganalisa senyawa bioaktif di ekstrak daun *Calophyllum inophyllum*.

Hasilnya, di tiap-tiap daerah kandungan bioaktifnya tidak seragam.

5. S.r. Thengane, et. al. (2006)

melakukan penelitian tentang *Micropropagation of Indian Laurel (Calophyllum Inophyllum)*, a source of anti-HIV compounds. Penelitian ini bertujuan untuk menumbuhkan tanaman nyamplung dari *seed plant*. Biji nyamplung pertama kali mengalami proses pencucian dan perendaman agar steril. Setelah itu, biji ini di inokulasi pada media WPM yang telah disterilkan. Dari hasil penelitian, tanaman yang mengalami proses ini memiliki rata-rata kelangsungan hidup sebesar 77% setelah 5 minggu.

6. Anna Iskandari (2010)

melakukan penelitian tentang Isolasi dan Elusidasi struktur quercetrin dari daun nyamplung. Sebanyak 5 kg serbuk kering daun nyamplung dimaserasi dalam 17 L methanol selama 24 jam. Filtrat yang didapat kemudian dipekatkan lagi. Ekstrak yang sudah pekat kemudian dilarutkan kembali dalam nHeksane dengan cara ekstraksi liquid-liquid. Ekstrak yang mengandung methanol (lapisan bawah) diambil kemudian dihilangkan methanolnya sehingga didapatkan ekstrak kering yang selanjutnya di uji menggunakan Kromatografi Lapis Tipis. Setelah di uji dan membandingkan dengan data pada referensi, maka senyawa yang diperoleh dari proses isolasi tersebut adalah senyawa quercetrin (quercetrin-3-O-rhamnosida) yang termasuk ke dalam golongan flavonoid glikosida.

7. Pai, B. R. et. al. (1966)

Melakukan penelitian Mengenai kandungan Triterpenes yang ada pada *Calophyllum inophyllum linn.* Objek penelitian yang digunakan dalam penelitiannya adalah daun nyamplung. Hasil ekstraksi daun nyamplung dengan n-Heksane menghasilkan campuran solida yang mengandung triterpenes yang kemudian di uji

menggunakan *Chromatography* untuk membuktikannya. Hasil *Chromatography* menunjukkan bahwa sampel mengandung 4 jenis komponen kristal, A, B, C, dan D yang dibedakan menurut tingkat kepolarannya. Dimana kristal A tersusun atas 3 triterpenes yaitu *canophyllal*, *canophyllol*, dan *canophyllic acid*. Kristal B dianalisa sebagai senyawa dengan rumus molekul $C_{30}H_{48}O_3$. Sementara kristal C dianalisa sebagai komponen dengan rumus molekul $C_{30}H_{50}O_2$. Dan Komponen D, dianalisa sebagai komponen dengan rumus molekul $C_{30}H_{50}O_3$.

8. Friday, J. B. And Okano, D. (2006)

Dalam penelitiannya yang berjudul *Calophyllum inophyllum* telah disebutkan bahwa tanaman ini merupakan jenis tanaman yang dapat hidup di daerah dengan suhu tropis dan biasanya seringkali ditemukan disekitar bibir pantai. *Calophyllum inophyllum* tumbuh ditempat yang bertemperatur hangat atau sedang dan tidak cocok tumbuh pada area yang sangat dingin dengan udara yang kering. *Calophyllum inophyllum* ini memiliki banyak manfaat, selain sebagai bahan obat-obatan dan untuk membuat *furniture*, fungsi lain tanaman ini adalah dapat berguna untuk menahan angin kencang, pengikisan daerah pantai oleh gelombang laut, dan lain-lain. Tanaman ini tumbuh dengan baik di wilayah dengan tanah yang bereongga (tanah berpasir). Tanaman ini memiliki kurang lebih 190 species, kebanyakan berasal dari Asia dan Kepulauan Pasifik. Bahkan di Indonesia, beberapa species bahkan dikatakan langka dan hanya ada di Indonesia.

9. Pretto, J.B. et. al. (2004)

Pretto et. al. Membuat suatu penelitian yang bertujuan untuk mencari fraksi / komponen yang bersifat sebagai antimikroba yang terdapat dalam *Calophyllum Brasiliensi*. Prosedurnya adalah, bagian tanaman yang akan digunakan untuk percobaan (akar, batang, daun, dan buah) dijadikan bentuk serbuk. Kemudian bahan tersebut

di maserasi dengan menggunakan methanol selama 7 hari dan didiamkan pada suhu ruangan. Setelah diambil larutan ekstraknya kemudian dievaporasi untuk menghilangkan sisa campuran pelarut yang masih ada. Setelah itu kemudian *crude extract* dilarutkan dalam chloroform untuk memisahkan fraksi polar dan nonpolarnya. Fraksi polar dan non polar kemudian di uji kandungannya menggunakan TLC. Untuk menguji sifat antimikroba ekstrak, digunakan beberapa mikroorganisme, diantaranya : *Bacillus Aureus*, *Enterobacter cloacae*, *Eschericia coli*, *Proteus mirabilis*, dan lain sebagainya. Dari hasil penelitian tersebut didapatkan bahwa dari ke empat bagian tanaman tersebut, tanaman yang memiliki sifat antimikroba paling baik adalah pada bagian daun.

10. Guttiferae, L. (2009)

Menyebutkan bahwa daun dari *Calophyllum inophyllum* mengandung saponin dan *hydrocyanic acid* yang beracun untuk ikan. Getah yang dimiliki oleh tanaman ini kayak akan turunan senyawa coumarin yang kompleks, beberapa diantaranya ada yang *piscicidal* dan beberapa *insecticidal*. Variasi jenis-jenis *xanthone* juga ditemukan dalam akar dan batangnya. Salah satu jenis *xanthone* yang biasa disebut *jacareubin* hampir selalu ada dalam semua *genus Calophyllum* tapi sangat jarang ditemukan diluar *genus* ini.

11. Malarvizhi P dan Ramakhrisnan N (2011)

Penelitian yang berjudul GC-MS analysis of biologically active compound in leaves of *Calophyllum inophyllum* ini menghasilkan bahwa ekstrak dari *Calophyllum inophyllum* ini mengandung banyak hydrocarbon, komponen phenolic da grup keton. Penelitian ini menggunakan daun *Calophyllum inophyllum* yang telah dibuat menjadi serbuk yang kemudian di maserasi dengan alkohol selama 24 jam. Ekstrak kemudian disaring dari

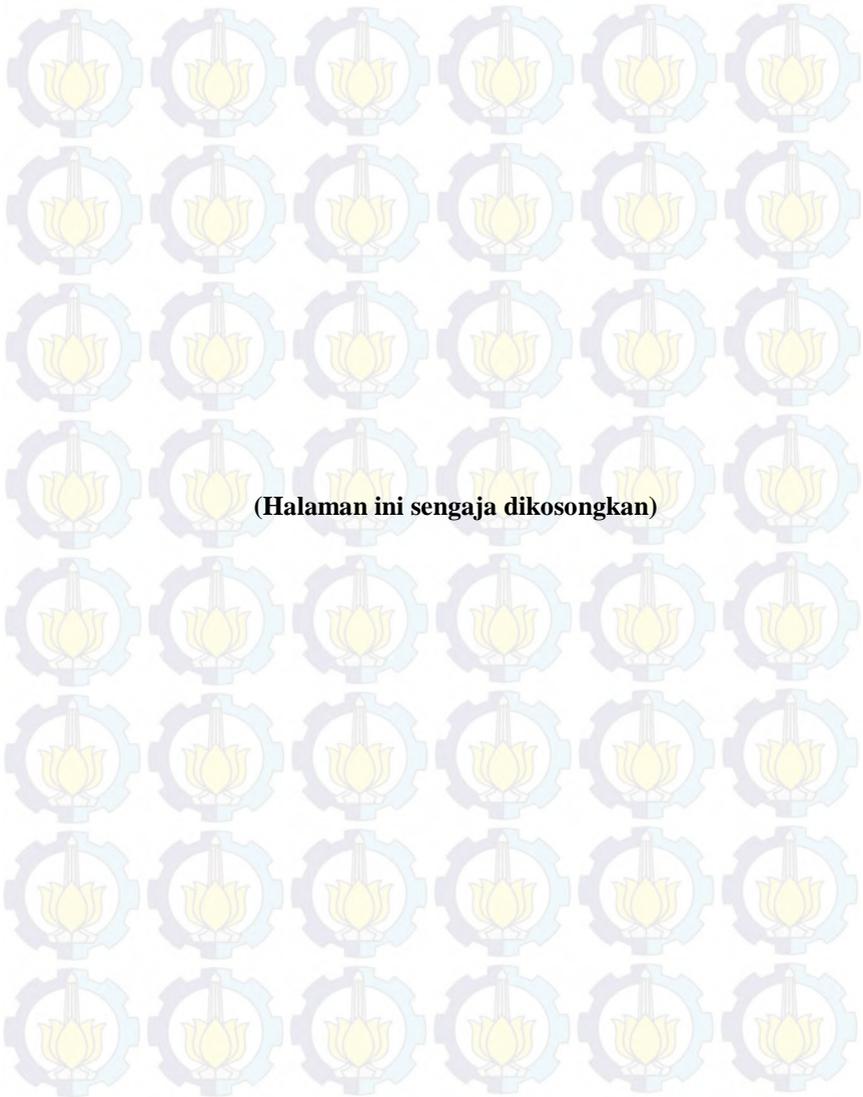
ampasnya, kemudian dikentalkan lalu di analisa menggunakan GC-MS.

12. Isaivani Indrakumar et al (2012)

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui komponen *phytochemical* yang terkandung dalam daun *Calophyllum inophyllum*. Daun *Calophyllum inophyllum* segar dikeringkan terlebih dahulu selama 15 hari lalu diblender hingga halus. Serbuk daun tersebut kemudian dilarutkan dalam 3 pe larut yang berbeda yaitu Petroleum Eter, Methanol, dan Chloroform kemudian di ekstraksi menggunakan soklet. Ekstrak yang dihasilkan kemudian di uji kandungan senyawanya menggunakan Mayer's test untuk uji alkaloids, Benedict's test untuk uji karbohidrat, Modified Borntrager's test untuk uji glikosid, Froth test untuk uji saponin, Xanthoproteic untuk uji protein, Alkaline reagent test untuk uji flavonoids, deteksi steroid, anthraquinone oleh Harbone, dan deteksi diterpenes, phenol dan coumarin oleh Mace.

13. Praveena Ch, et al (2013)

Penelitian ini bertujuan untuk menganalisa komponen fitokimia dalam daun *Calophyllum inophyllum*. Serbuk daun *Calophyllum inophyllum* dimaserasi menggunakan methanol selama 7 hari dalam labu alas datar. Ekstrak yang dihasilkan kemudian disaring lalu dikentalkan dan dimasukkan dalam desikator. Ekstrak yang terbentuk kemudian di uji menggunakan TLC (*Thin Layer Chromatography*). Hasil analisa menyebutkan bahwa ekstrak daun tersebut mengandung flavonoidal, glycosides, dan steroidal glycosides.



BAB III METODOLOGI PENELITIAN

III.1 Proses Pemisahan dan Pemurnian Xanthone dan Coumarin serta Variabel

1. Ekstraksi daun nyamplung dengan *Soxhlet Extraction*
 - a. Solid berupa bubuk daun nyamplung 15 g
 - b. Pelarut yang digunakan adalah metanol teknis 98% 300 ml
2. Pemisahan dan pemurnian xanthone dan coumarin dengan ekstraksi liquid-liquid
 - a. Variabel pelarut total yang digunakan adalah 10, 30, 50, dan 70 (g/g)
 - b. Jenis Pelarut yang digunakan (Polar-Non Polar) Metanol - Petroleum Eter
 - c. Rasio pelarut (Polar-Non Polar) yang digunakan :
 - 1) 25 : 75 (g/g)
 - 2) 50 : 50 (g/g)
3. Identifikasi produk
 - a. Ekstrak daun diuji menggunakan TLC dan GC-MS untuk analisa kualitatif
 - b. *Spectrophotometer* UV-Vis untuk analisa kuantitatif

III.2 Bahan dan Peralatan

III.2.1 Bahan

- | | |
|--------------------------|-------------------|
| 1. Bubuk daun nyamplung | 10. Akuades |
| 2. N-Heksane teknis | 11. Kertas pH |
| 3. Metanol (98%) teknis | 12. Kertas saring |
| 4. Petroleum eter teknis | 13. Kertas TLC |
| 5. Asam Asetat | 14. Erlenmeyer |
| 6. Etil Asetat | 15. Beaker glass |
| 7. Hotplate | 16. Pipet ukur |
| 8. Corong kaca | 17. Pipet tetes |
| 9. Stirer magnetik | 18. Gelas ukur |

III.2.2 Peralatan

1. Labu alas datar
2. Soxhlet
3. Kondensor reflux
4. Thermometer
5. Neraca analitik
6. Corong pemisah
7. Tabung reaksi
8. Pipa kapiler

III.3 Metode Penelitian

III.3.1 Bahan Penelitian

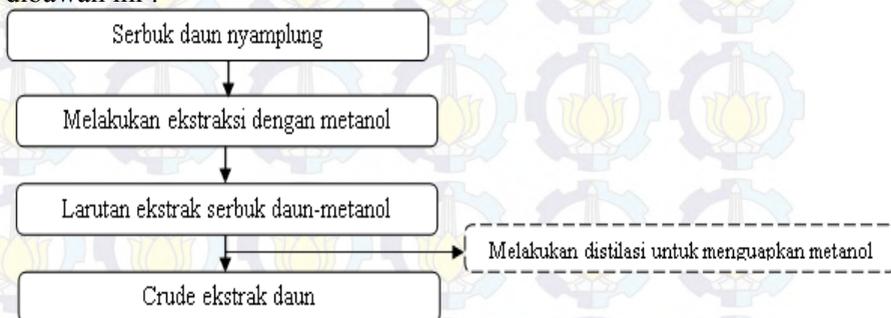
Serbuk daun nyamplung diperoleh dari Koperasi Jarak Lestari, yang berada di Cilacap, Jawa Tengah. Bahan-bahan kimia seperti n-heksane, metanol, petroleum eter dibeli dari PT. Bratachem; *Thin-layer chromatography* (TLC) *aluminium plate* (20 x 20cm x 250 µm) dan akuades diperoleh dari laboratorium Teknologi Biokimia ITS. Komponen standar yang digunakan meliputi coumarin dari Sigma Aldrich (C4261) dan xanthone dari Sigma Aldrich (X600).

III.3.2 Prosedur Penelitian

III.3.2.1 Ekstraksi Daun Nyamplung dengan Metode *Soxhlet Extraction*

Metode yang digunakan adalah metode ekstraksi solid-liquid dengan menggunakan *soxhlet extraction* yang diadaptasi dari Indrakumar, et al (2012). Metode ini dilakukan untuk mendapatkan *crude extract* daun nyamplung. Bubuk daun nyamplung yang digunakan dalam penelitian ini didapatkan dari 5 kg daun nyamplung segar yang dikeringkan kemudian diblender halus hingga menjadi bentuk serbuk. Untuk prosedur penelitian, sebanyak 15 g bubuk daun nyamplung diekstraksi menggunakan 300 ml pelarut metanol teknis 98%. Ekstraksi ini dilakukan menggunakan *soxhlet* hingga seluruh solid yang terkandung dalam bubuk daun nyamplung telah terekstraksi sempurna. Setelah didapatkan larutan ekstrak daun, larutan kemudian

dipekatkan dengan cara distilasi untuk menguapkan semua metanolnya. Setelah didapatkan *crude* ekstrak daun, *crude* ekstrak tersebut lalu disimpan dalam eksikator selama 24 jam sebelum digunakan untuk prosedur selanjutnya. Skema percobaan untuk mendapatkan *crude* ekstrak nyamplung dapat dilihat pada gambar dibawah ini :



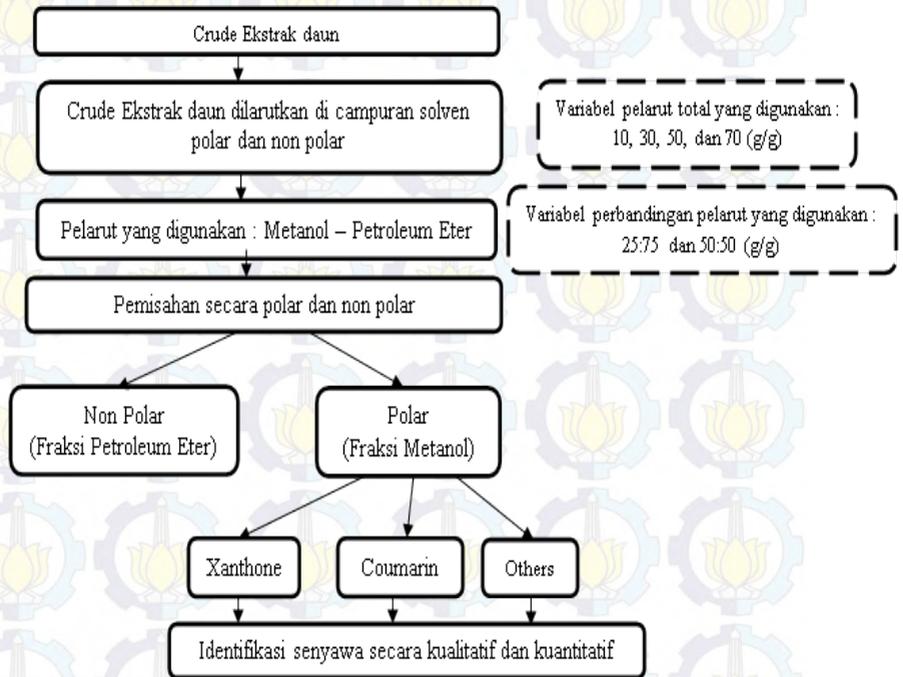
Gambar III.1 Skema Tahapan Ekstraksi Daun Nyamplung

III.3.2.2 Pemisahan dan Pemurnian Xanthone dan Coumarin dengan Metode Ekstraksi Liquid-Liquid

Metode ini dilakukan untuk menghilangkan pengotor sekaligus memurnikan dan memisahkan antara fraksi polar dan non polar yang masih ada dalam *crude* ekstrak. *Crude* ekstrak yang diperoleh dari prosedur sebelumnya dicampurkan dengan pelarut polar dan non polar yaitu metanol dan petroleum eter dimana terdapat 4 buah variabel pelarut total yang digunakan, yaitu 10, 30, 50 dan 70 (g/g). Sedangkan perbandingan rasio pelarut polar non polar telah ditentukan sebanyak 2 variabel, yaitu 25 : 75 dan 50 : 50 (g/g). Misalnya pada variabel pelarut total 50 dan variabel rasio pelarut 50:50, untuk 1 gram *crude* ekstrak, maka dibutuhkan 50 gram pelarut total (campuran metanol dan petroleum eter). Dimana dari 50 gram pelarut tersebut, 25 gram merupakan metanol dan 25 gram berikutnya merupakan petroleum eter.

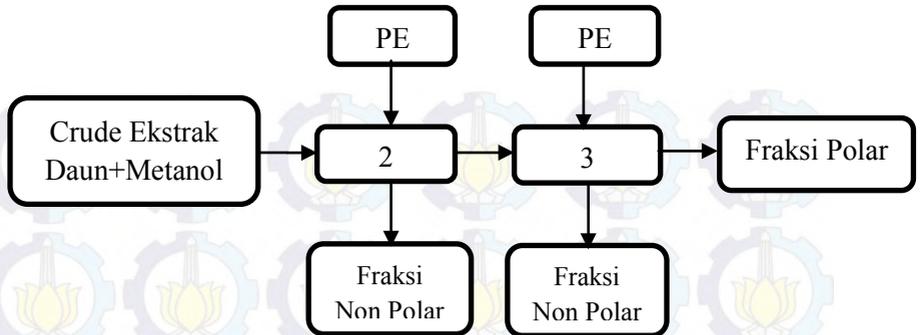
Crude ekstrak yang sudah ditimbang, kemudian dicampur dengan pelarut polar (metanol) dan dimasukkan ke dalam beaker glass, lalu diaduk dengan menggunakan stirer magnetik hingga

terlarut sempurna. Setelah pelarut polar dan dan crude ekstrak larut sempurna, kemudian ditambahkan pelarut non polar (petroleum eter) dan diaduk kembali dengan stirer magnetik selama 45 menit. Larutan *crude* ekstrak tersebut lalu dimasukkan ke dalam corong pemisah dan didiamkan selama 2 jam hingga terbentuk 2 buah layer. Layer bawah yang merupakan campuran dari fraksi polar dan metanol dari *crude extract* dipisahkan dengan layer atas yang mengandung fraksi non polar, pengotor, dan petroleum eter. Lalu layer yang terbentuk diambil dan diuji kandungan xanthone dan coumarinnya dengan menggunakan TLC dan GC-MS untuk uji kualitatif serta Spectrophotometer UV-Visible untuk uji secara kuantitatif.



Gambar III.2 Skema Pemisahan Xanthone dan Coumarin dari PLF

Sedangkan untuk proses multiple extraction crude ekstrak daun nyamplung dapat dilihat pada gambar seperti berikut :



Gambar III.3 Skema Proses Multiple Extraction Crude Ekstrak Daun Nyamplung

Layer bawah yang merupakan campuran dari fraksi polar dan metanol dari *crude extract* dipisahkan dengan layer atas yang mengandung fraksi non polar, pengotor, dan petroleum eter. Kemudian pada layer bawah yang telah dipisahkan tersebut ditambahkan petroleum eter sebanyak 25 g ram. Lalu diuji menggunakan TLC untuk mengetahui apakah xanthone dan coumarin telah terpisah sempurna. Apabila hasil yang didapatkan belum se suai, maka dari campuran tersebut diambil kembali layer bawah yang merupakan campuran dari fraksi polar dan metanol dari *crude extract* serta dipisahkan dengan layer atas yang mengandung fraksi non polar, pengotor, dan petroleum eter. Kemudian pada layer bawah yang telah dipisahkan tersebut ditambahkan 25 gram petroleum eter dan diuji kembali dengan menggunakan TLC. Langkah diulangi hingga didapatkan hasil yang sesuai.

Setelah melakukan seluruh prosedur percobaan diatas, maka dapat diketahui kondisi optimum untuk memperoleh xanthone dan coumarin dari *crude extract*.

III.3.2.3 Analisa Xanthone dan Coumarin Menggunakan TLC

Fraksi polar yang didapatkan kemudian diuji kandungan xanthone dan coumarinnya menggunakan TLC (*Thin Layer*

Chromatography). TLC digunakan untuk menguji secara kualitatif keberadaan senyawa xanthone dan coumarin didalam fraksi polar ekstrak daun. Sebelum dilakukan uji TLC, mula-mula kertas TLC yang telah ditetesi oleh sampel direndam dalam *mobile phase* dengan kadar n-hexane:etil asetat:asam asetat sebesar 90:40:1 (v/v). Perendaman dalam *mobile phase* dilakukan dalam botol tertutup rapat. Pada saat perendaman, tinggi *mobile phase* tidak diperbolehkan melebihi area batas atas yang telah ditentukan pada kertas TLC. Setelah perendaman, kertas TLC kemudian dikeringkan pada suhu ruang lalu dilakukan pembacaan spot menggunakan alat UV (UVITEC Cambridge) dan digunakan lampu UV dengan panjang gelombang 254 dan 365 nm.

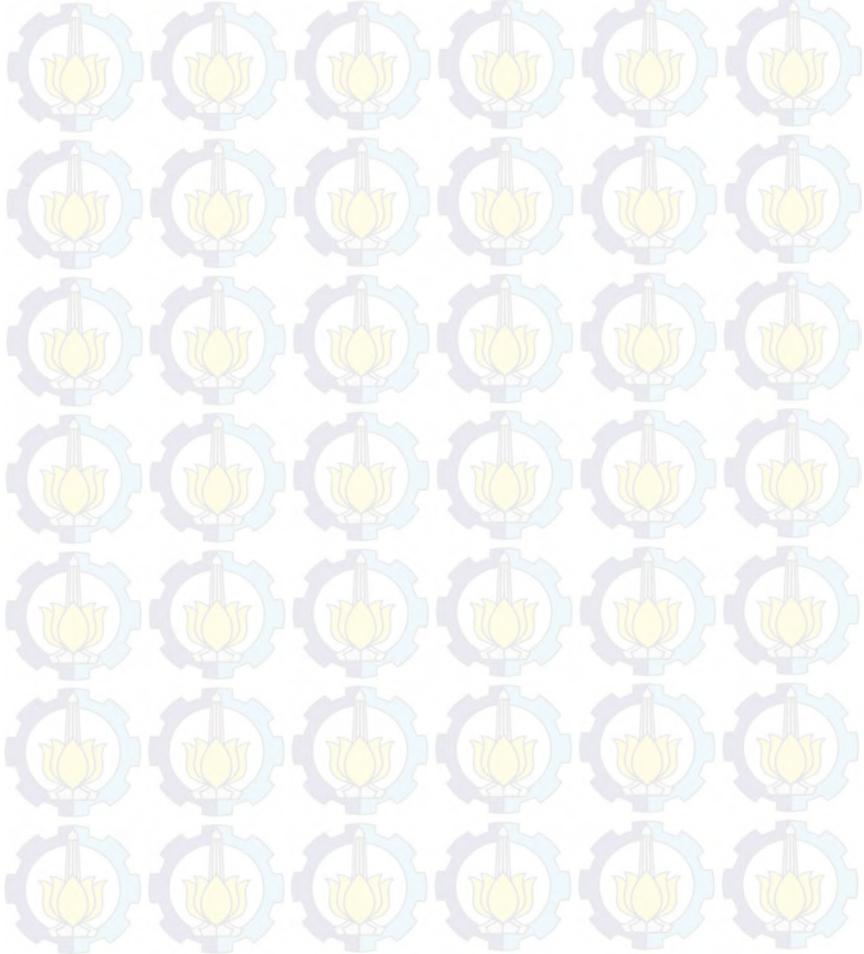
III.3.2.4 Analisa Xanthone dan Coumarin Menggunakan GC-MS

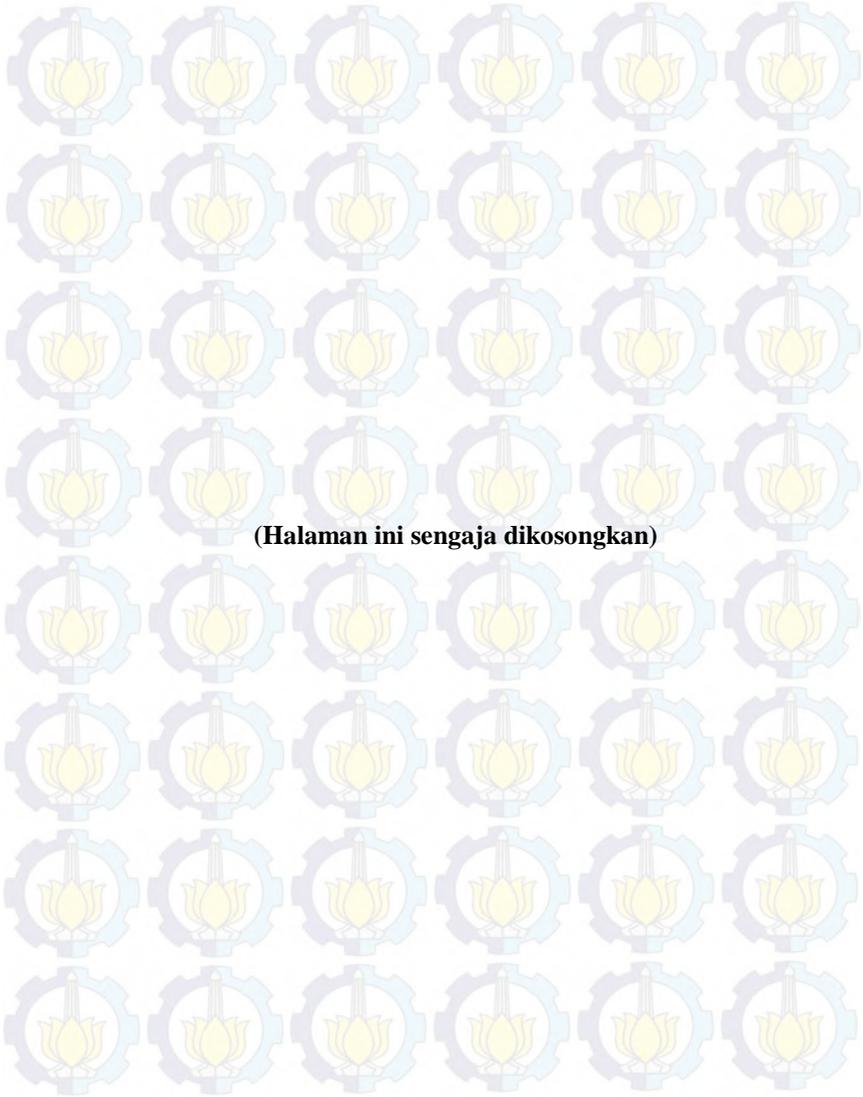
Analisa menggunakan analisa GC-MS dengan GC Agilent 6890N dengan autosampler. Kolom kapiler, HP5 5% fenilmetilsiloksan panjang 30 m x 320 μm i.d., dengan ketebalan lapisan fase diam 0,25 μm , detektor menggunakan MS, Agilent 6971 inert mass selective detector (Agilent Tech. Palo Alto, California, USA). Suhu injector diatur pada suhu 250⁰ C. Suhu dinaikkan 2⁰C/menit hingga suhu 100⁰ C lalu dinaikkan 5⁰C/menit hingga suhu 290⁰ C dan dijaga tetap pada suhu tersebut selama 10 menit. Gas pembawa yang digunakan adalah Helium, Alphagaz. Transfer line dengan suhu 280⁰ C, MS Quadrupole 150⁰ C, MS Source 230⁰ C. Volume injeksi sebanyak 5 μl , menggunakan model inlet split 1:10 dengan laju alir gas dalam kolom sebesar 1,3 ml/menit.

III.3.2.5 Analisa Xanthone dan Coumarin Menggunakan Spectrophotometer UV-Visible

Analisa Spectrometry UV-Vis menggunakan alat Thermo Scientific Genesys 10S UV Scanning. Scanning panjang gelombang serapan maksimum dimulai dari 190-900 nm dan dipilih panjang gelombang dengan absorbansi terbesar. Larutan standar coumarin yang digunakan untuk mencari panjang

gelombang serapan maksimum memiliki konsentrasi 0,08 mg/ml. Kurva kalibrasi coumarin yang digunakan dengan konsentrasi 0,08; 0,06; 0,03; 0,01; 0,005; 0,001 mg/ml. Larutan standar xanthone yang digunakan untuk mencari panjang gelombang serapan maksimum memiliki konsentrasi 0,1 mg/ml. Kurva kalibrasi xanthone yang digunakan dengan konsentrasi 0,1; 0,08; 0,06; 0,03; 0,01; 0,005 mg/ml





(Halaman ini sengaja dikosongkan)

BAB IV

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui senyawa yang terkandung di dalam fraksi polar dan non polar daun nyamplung, mengetahui cara untuk mengisolasi senyawa xanthone dan coumarin yang terkandung di dalam fraksi polar daun nyamplung, serta mengetahui kondisi proses pemisahan xanthone dan coumarin yang optimum.

Dalam penelitian ini, akan dilakukan proses pemisahan solid-liquid antara serbuk daun nyamplung dengan pelarut metanol sehingga akan diperoleh crude ekstrak daun. Selanjutnya dilakukan proses pemisahan dengan menggunakan ekstraksi liquid-liquid antara pelarut polar dengan pelarut non polar. Pelarut polar yang digunakan adalah metanol sedangkan pelarut non polar yang digunakan adalah petroleum eter. Dari hasil pemisahan tersebut akan diperoleh Polar Lipid Fraction (PLF) dan Non Polar Lipid Fraction (PLF) yang selanjutnya akan dianalisa secara kualitatif dengan menggunakan metode Thin Layer Chromatography (TLC) dan Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS), serta secara kuantitatif dengan menggunakan metode *Spectrophotometry UV-Vis*.

IV.1 Pemisahan dengan Ekstraksi Solid-Liquid

Solid yang digunakan merupakan serbuk daun nyamplung yang sudah dikeringkan dengan kadar air sebesar $7,38 \pm 0,13$ % dan liquid yang digunakan merupakan metanol teknis. Penggunaan pelarut metanol pada proses ekstraksi solid-liquid ini dikarenakan % yield ekstrak daun yang diperoleh akan lebih besar dibandingkan jika menggunakan petroleum eter dan kloroform, selain itu xanthone dan coumarin termasuk ke dalam fraksi polar sehingga senyawa tersebut dapat terisolasi dari daun jika digunakan metanol (Indrakumar et al, 2012).

Ada banyak metode yang dapat digunakan untuk mengisolasi senyawa bioaktif khususnya untuk menganalisa

xanthone dan coumarin. Kemudian dilakukan analisa perbandingan metode untuk mengetahui metode yang efektif. Analisa tersebut disajikan pada **Tabel IV.1** berikut

Tabel IV.1.1 Perbandingan Metode Ekstraksi yang Digunakan

	Modified Soxhlet Extraction^a	Maserasi^b	Ekstraksi Soxhlet^c
Waktu Treatment	Lama (11-12 jam)	Sangat lama (3-4 hari)	Lama (3-18 jam)
Ruang Instalasi	Butuh tempat yang luas karena peralatan banyak	Tidak membutuhkan tempat yang luas	Tidak membutuhkan tempat yang luas
Pengoperasian	Rumit, langkah yang dibutuhkan cukup banyak	Mudah	Relatif mudah
Waktu yang Dibutuhkan untuk konstruksi alat	Butuh waktu yang lama	Cepat	Cepat
Pemeliharaan	Sulit karena banyaknya alat	Mudah	Mudah

a diadaptasi dari Fabian et al, 2009

b diadaptasi dari Sasidharan et al, 2011

c diadaptasi dari Yunitasari, E.P., 2008

Dari hasil analisa penulis yang dikutip dari berbagai sumber pada Tabel IV.1, dapat disimpulkan bahwa metode ekstraksi soxhlet merupakan metode yang efektif untuk mendapatkan crude ekstrak daun untuk ekstraksi solid-liquid. Ekstraksi soxhlet tidak membutuhkan waktu yang terlalu lama, tidak membutuhkan tempat yang luas untuk alat, dan relatif lebih mudah untuk pengoperasian dan pemeliharaan.

Pada proses ekstraksi soxhlet ini digunakan 15 gram serbuk daun nyamplung kering dan menggunakan metanol sebanyak 300 ml. Proses ekstraksi soxhlet dilakukan hingga

pelarut di soxhlet yang awalnya hitam karena hasil ekstrak daun menjadi bening. Dari hasil ekstraksi solid-liquid tersebut akan diperoleh crude ekstrak daun. Crude ekstrak daun dari proses ekstraksi soxhlet masih mengandung banyak pelarut, sehingga perlu diuapkan terlebih dahulu dengan proses distilasi. Hasil dari distilasi merupakan crude ekstrak daun yang akan digunakan untuk proses selanjutnya. Yield crude ekstrak daun yang diperoleh adalah sebesar $24,938 \pm 0,852\%$. Perhitungan yang digunakan berdasarkan dari Indrakumar, 2012 dengan rumus sebagai berikut:

$$\%yield = \frac{\text{berat dari crude ekstrak}}{\text{berat dari daun nyamplung kering}} \times 100\%$$

IV.2 Pemurnian dengan Ekstraksi Liquid-Liquid

Setelah mendapatkan crude ekstrak daun, langkah selanjutnya adalah masuk ke dalam variabel. Variabel yang digunakan adalah berbagai macam perbandingan antara crude ekstrak dan pelarut, serta perbandingan pelarut polar dan non polar. Pelarut polar yang digunakan pada percobaan ini adalah metanol, sedangkan untuk pelarut non polar yang digunakan adalah petroleum eter. Pemilihan solvent polar dan non polar ini berdasarkan *polarity index*. Air merupakan pelarut polar dengan nilai *polarity index* sebesar 9, sedangkan metanol merupakan pelarut agak polar dengan nilai *polarity index* sebesar 5,1. Petroleum eter adalah pelarut non polar dengan *polarity index* sebesar 0 (Sadek, 2002). Dengan dua sifat polaritas yang berbeda diharapkan senyawa polar yang terdapat dalam daun nyamplung akan terbawa ke dalam metanol, sedangkan untuk senyawa non polar akan terbawa ke dalam petroleum eter.

Tabel IV.2.1 Polaritas Solvent

Relative Polarity	Formula	Group	Solvents
Non polar 	R-H	Alkanes	Petroleum ethers, hexanes, ligroin
	Ar-H	Aromatics	Toluene
	R-O-R	Ethers	Diethyl ether
	R-X	Alkyl halides	Trichloromethane, chloroform
	R-COOR	Esters	Ethyl acetate
	R-CO-R	Aldehydes, Ketones	Acetone, MEK
	R-NH ₂	Amines	Phyridine, triethylamine
	R-OH	Alcohols	MeOH, EtOH, IPA, Butanol
	R-COHN ₂	Amides	Dimethylformamide
	R-COOH	Carboxylic Acid	Ethanoic acid
	Polar	H-O-H	Water

(Sadek, P. 2002)

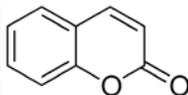
Pelarut yang digunakan untuk percobaan kali ini adalah metanol teknis 80%. Alasan penggunaan metanol teknis 80% dikarenakan proses separasi fraksi polar lebih terlihat jelas dibandingkan dengan metanol teknis 98% dan 90% (Adzkiya, et al. 2015).

Variabel pelarut total yang digunakan adalah 10, 30, 50, dan 70 (dalam fraksi berat). Sedangkan perbandingan pelarut polar dan non polar yang digunakan adalah 25:75 dan 50:50 (g/g). Setelah crude ekstrak terlarut sempurna dalam pelarut, dilakukan ekstraksi liquid-liquid dengan menggunakan corong pemisah. Densitas petroleum eter (660 kg/m^3) lebih kecil dibandingkan densitas metanol (840 kg/m^3), sehingga layer atas pada corong pemisah merupakan petroleum eter (non polar) dan layer bawah merupakan metanol (polar). Hasil pemisahan dari fraksi polar dan non polar ini kemudian akan dianalisis secara kualitatif dengan menggunakan analisa TLC (*Thin Layer Chromatography* dan

GC-MS (*Gas Chromatography-Mass Spectrometry*). Sedangkan untuk analisa secara kuantitatif akan digunakan analisa) untuk mengetahui senyawa yang terkandung dalam fraksi polar dan non polar, serta analisa Spectrophotometry UV-Vis untuk mengetahui kandungan xanthone dan coumarin yang terdapat dalam daun nyamplung.

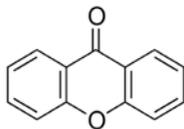
IV.3 Standar Xanthone dan Coumarin

Coumarin merupakan biosintesis senyawa yang berasal dari jalur sikimat, atau masih sejalar dengan golongan fenil propanoid. Dari segi biogenetik, kerangka benzopiran-2-on dari coumarin berasal dari asam-asam sinamat melalui orto-hidrolaksi. Asam orto-kumarat yang dihasilkan setelah menjalani isomerisasi cis-trans mengalami kondensasi (Lenny, 2006). Berat molekul dari Coumarin adalah 146,14 dan dengan titik didih sebesar 298°C.



Gambar IV.3.1 Struktur Senyawa Coumarin

Xanthone merupakan senyawa dengan kerangka dasarnya dua fenil yang dihubungkan dengan jembatan karbonil dan oksigen (eter). Xanthone mempunyai kerangka dasar yang terdiri atas 13 atom karbon yang membentuk susunan C6-C1-C6. Biosintesis senyawa xanthona belum diketahui secara jelas namun diduga masih berhubungan dekat dengan biosintesis senyawa flavonoid dan stilbenoid. Hal ini bisa dilihat dari tipe oksigenasi dua jenis cincin aromatik yaitu satu cincin aromatik (A) memperlihatkan ciri berasal dari jalur sikimat dan satu cincin (B) lagi memperlihatkan ciri berasal dari jalur asetat-malonat. Berat molekul dari xanthone adalah 196,20 dan dengan titik didih 349-350 °C.



Gambar IV.3.2 Struktur Senyawa Xanthone

Jika dilihat dari sifat kepolarannya, coumarin bersifat lebih polar dibandingkan dengan xanthone. Hal ini dapat dilihat dari hasil *Thin Layer Chromatography* (TLC) yang menunjukkan semakin polar suatu senyawa, lokasi spot sampel akan berada di bawah, dibandingkan dengan sampel non polar yang berada diposisi lebih atas.



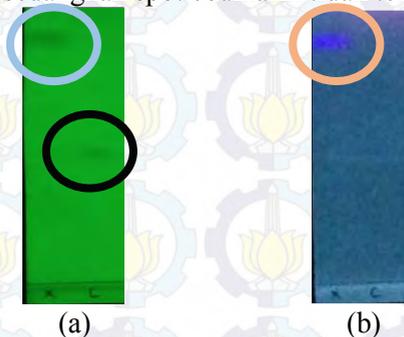
Gambar IV.3.3 Spot Hasil TLC Larutan Standar Xanthone dan Coumarin

IV.4 Hasil Analisa Thin Layer Chromatography (TLC)

Analisa Thin Layer Chromatography merupakan analisa secara kualitatif. Melalui hasil analisa ini dapat diketahui apakah pada fraksi polar dan non polar mengandung senyawa xanthone dan coumarin. Identifikasi xanthone dan coumarin dalam ekstrak daun nyamplung dilakukan dengan meneteskan sampel dan larutan standar ke kertas TLC. Kemudian melihat hasil spot sampel dengan lampu UV pada panjang gelombang tertentu.

Menurut Alegantina tahun 2010, spot standar coumarin akan terbaca dengan menggunakan lampu UV pada panjang gelombang 366 nm dengan bercak berwarna biru flourensi.

Sedangkan, senyawa xanthone terlihat spotnya pada panjang gelombang 254 nm (Yanti, 2004). Pada penelitian ini, digunakan panjang gelombang 254 nm karena spot xanthone dan coumarin terlihat jelas dengan warna spot kehijauan. Pada panjang gelombang 365 nm, spot xanthone terlihat jelas dengan warna biru flourensi, sedangkan spot coumarin tidak terlihat.



Gambar IV.4.1 Spot Sampel Xanthone dan Coumarin pada Panjang Gelombang yang Berbeda

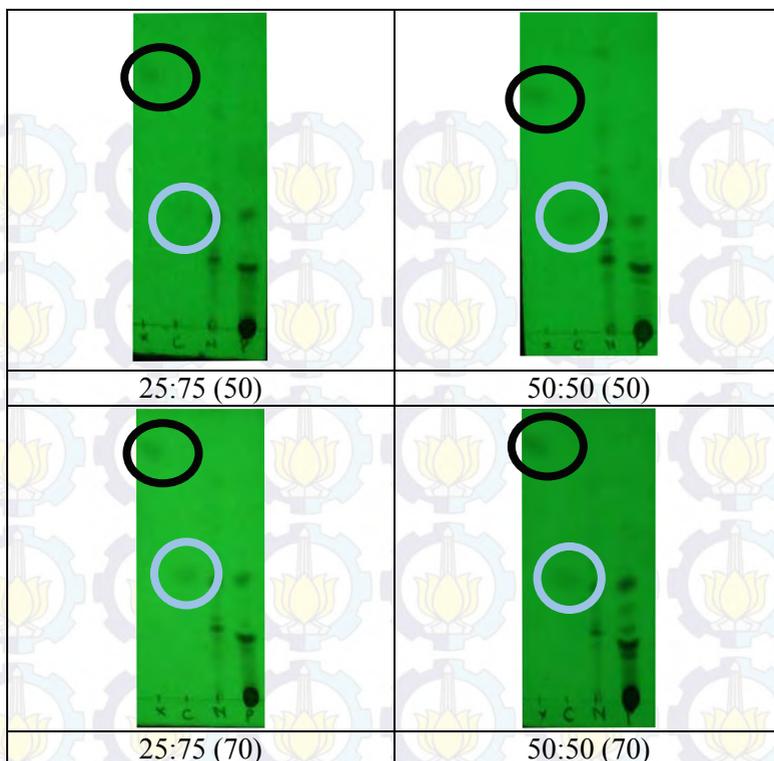
(a) Spot Xanthone (Kiri) dan Coumarin (kanan) pada $\lambda = 254$ nm

(b) Spot Xanthone (Kiri) dan Coumarin (Kanan, Tidak Terlihat) pada $\lambda = 365$ nm

Percobaan ini menggunakan mobile phase dengan perbandingan antara n-hexane:etil asetat:asam asetat sebesar 90:10:1, v/v/v.



Gambar IV.4.2 Hasil TLC Sampel, Larutan Standar Xanthone, dan Larutan Standar Coumarin dengan Menggunakan *Mobile Phase* Hexane: Etil Asetat: Asam Asetat 90:10:1



Gambar IV.4.3 Hasil Analisa TLC pada Variabel Pelarut Total 50 dan 70

Berdasarkan gambar di atas, secara kualitatif dengan menggunakan lampu UV dengan panjang gelombang 254 nm dapat terlihat keberadaan spot yang sama dengan coumarin pada fraksi polar daun nyamplung. Pada fraksi non polar daun nyamplung juga terlihat keberadaan spot yang sama dengan coumarin. Sehingga dapat diindikasikan bahwa senyawa coumarin berada pada fraksi polar dan non polar daun nyamplung.

Secara kualitatif dengan menggunakan lampu UV dengan panjang gelombang 254 nm, keberadaan spot xanthone dapat

terlihat pada fraksi non polar daun nyamplung. Pada fraksi polar daun nyamplung tidak terlalu terlihat adanya spot xanthone. Namun, khusus untuk senyawa xanthone, jika menggunakan lampu UV dengan panjang gelombang 365 nm dapat terlihat keberadaan spot yang sama dengan xanthone di fraksi polar daun nyamplung. Sehingga dapat diindikasikan bahwa senyawa xanthone berada pada fraksi polar dan non polar daun nyamplung.

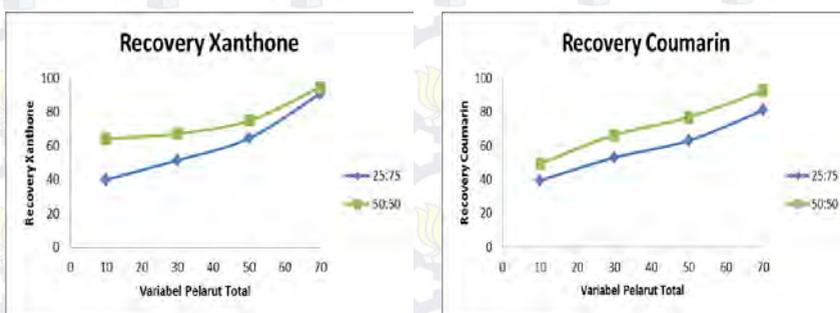
IV.5 Hasil Analisa Spectrometry UV-Visible

Untuk analisa kuantitatif, digunakan analisa Spectrometry UV-Vis untuk mengetahui kandungan xanthone dan coumarin. Pembuatan kurva kalibrasi menggunakan larutan standar, digunakan panjang gelombang serapan maksimal tiap masing-masing senyawa.

Pada studi sebelumnya menyatakan bahwa panjang gelombang maksimal xanthone pada 243, 254, 316 dan 320 nm (Aisha, 2013). Menurut Yanti tahun 2004, senyawa xanthone dengan pelarut metanol memiliki serapan maksimum pada panjang gelombang 256, 270, dan 330 nm. Pada studi kali ini, serapan maksimum xanthone terdapat pada panjang gelombang 332 nm. Panjang gelombang ini akan digunakan sebagai acuan untuk kurva kalibrasi xanthone dan pembacaan absorbansi pada sampel untuk mengetahui kadar xanthone dalam sampel.

Berdasarkan sigma-aldrich, panjang gelombang maksimum coumarin pada 270-352 nm. Dari penelitian sebelumnya, spektrum UV coumarin menghasilkan serapan maksimum pada panjang gelombang 203,8; 228,2; 252,6; 297,4; dan 344,9 nm, sedangkan serapan maksimum coumarin murni pada 274 dan 311 nm yang merupakan serapan dari cincin benzen dan α -pyron (Adfa, 2006). Pada studi kali ini, serapan maksimum coumarin pada panjang gelombang 308 nm. Panjang gelombang ini akan digunakan sebagai acuan untuk kurva kalibrasi coumarin dan pembacaan absorbansi pada sampel untuk mengetahui kadar coumarin dalam sampel.

Untuk mendapatkan persamaan kurva kalibrasi yang tepat, maka dilakukan pengukuran absorbansi pada larutan standart xanthone dan coumarin dengan berbagai konsentrasi pengenceran. Persamaan kurva kalibrasi yang dihasilkan tersebut digunakan untuk menghitung konsentrasi pada setiap sampel. Setelah konsentrasi setiap sampel diketahui, selanjutnya dilakukan perhitungan untuk mengetahui recovery, kadar, dan yield setiap sampel pada semua variabel. Dari hasil perhitungan tersebut dapat dibuat grafik yang menunjukkan hubungan antara variabel dengan respon yang dihasilkan yang digunakan.



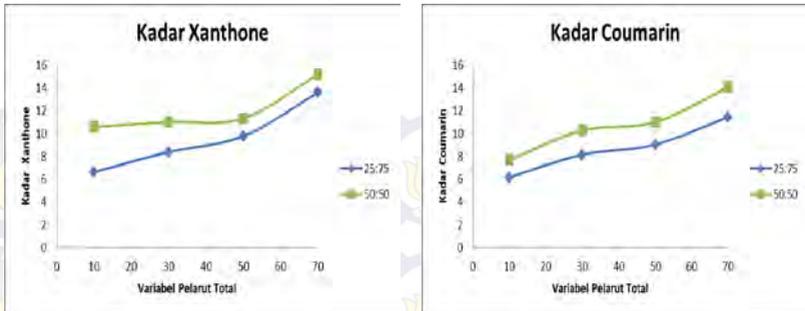
Gambar IV.5.1 Grafik Pengaruh Variabel Pelarut Total terhadap Recovery Xanthone dan Coumarin

Tabel IV.5.1 Pengaruh Variabel Pelarut Total terhadap Recovery Xanthone dan Coumarin

Pelarut Total	Metanol:PE	Xanthone	Coumarin
10	25:75	39,95 ± 10,02 %	39,37 ± 10,02 %
	50:50	64,13 ± 31,29 %	49,26 ± 14,32 %
30	25:75	51,47 ± 0,55 %	52,94 ± 3,57 %
	50:50	67,14 ± 1,75 %	66,27 ± 4,54 %
50	25:75	64,39 ± 15,70 %	63,03 ± 16,67 %
	50:50	74,79 ± 6,41 %	76,86 ± 6,81 %
70	25:75	90,80 ± 5,39 %	80,95 ± 1,72 %
	50:50	94,43 ± 0,96 %	92,62 ± 1,15 %

Grafik hubungan pengaruh antara variabel pelarut terhadap recovery diatas menunjukkan bahwa recovery akan semakin tinggi apabila variabel perbandingan pelarut total yang digunakan semakin tinggi. Hal ini ditunjukkan pada grafik pengaruh recovery xanthone dan coumarin yang menunjukkan recovery tertinggi ada pada variabel 70. Hal ini sesuai dengan literatur dimana perbandingan solid dan pelarut yang tinggi akan meningkatkan kesempatan komponen bioaktif pada crude ekstrak untuk berkontak dengan pelarut sehingga akan meningkatkan yield senyawa bioaktif sampai yield maksimum dan hal tersebut akan terus. Selain itu diketahui perbandingan pelarut polar:non polar pada variabel 50:50, merupakan variabel maksimum yang dapat mengambil xanthone dan coumarin. Dimana pada perbandingan tersebut diperoleh recovery xanthone $94,43 \pm 0,96$ % dan recovery coumarin $92,62 \pm 1,15$ %.

Pada penelitian kali ini diharapkan xanthone dan coumarin terpisah sempurna. Hal ini dapat dibuktikan dengan recovery xanthone di fraksi polar seharusnya lebih kecil karena sifatnya yang lebih non polar dibandingkan dengan coumarin. Sedangkan recovery coumarin diharapkan lebih besar karena sifatnya yang lebih polar. Dari hasil penelitian menunjukkan bahwa recovery xanthone dan coumarin sama-sama besar. Dimana hal ini menunjukkan xanthone dan coumarin berhasil banyak terambil dengan single extraction. Namun belum dapat dipisahkan secara sempurna. Oleh karena itu perlu dilakukan pemisahan xanthone dan coumarin dengan ekstraksi liquid-liquid untuk tahap kedua dan ketiga agar kedua senyawa tersebut dapat dipisahkan secara sempurna.



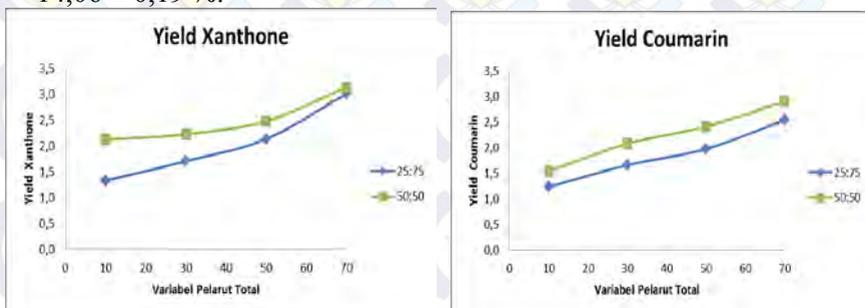
Gambar IV.5.2 Grafik Pengaruh Variabel Pelarut Total terhadap Kadar Xanthone dan Coumarin

Tabel IV.5.2 Pengaruh Variabel Pelarut Total terhadap Kadar Xanthone dan Coumarin

Pelarut Total	Metanol:PE	Xanthone	Coumarin
10	25:75	6,62 ± 1,66 %	6,17 ± 1,57 %
	50:50	10,58 ± 5,08 %	7,69 ± 2,20 %
30	25:75	8,38 ± 0,15 %	8,15 ± 0,49 %
	50:50	11,01 ± 0,28 %	10,27 ± 0,61 %
50	25:75	9,76 ± 2,39 %	9,04 ± 2,39 %
	50:50	11,32 ± 0,88 %	10,99 ± 0,87 %
70	25:75	13,59 ± 1,03 %	11,45 ± 0,05 %
	50:50	15,16 ± 0,17 %	14,06 ± 0,19 %
Crude Ekstrak		13,31 ± 1,29 %	12,58 ± 0,51 %

Grafik diatas merupakan hubungan pengaruh antara variabel perbandingan pelarut total dan variabel pelarut polar:non polar terhadap kadar xanthone dan coumarin yang dihasilkan. Hasil maksimum juga ditunjukkan pada variabel pelarut total 70

dan perbandingan metanol:petroleum eter 50:50 dengan pengaruh yang sama seperti pada recovery. Pada perbandingan tersebut terjadi kenaikan, dimana kadar xanthone pada crude ekstrak awal $13,31 \pm 1,29 \%$ menjadi $15,16 \pm 0,17 \%$, sedangkan kadar coumarin awal pada crude ekstrak adalah $12,58 \pm 0,51 \%$ menjadi $14,06 \pm 0,19 \%$.



Gambar IV.5.3 Grafik Pengaruh Variabel Pelarut Total terhadap Yield Xanthone dan Coumarin

Tabel IV.5.3 Pengaruh Variabel Pelarut Total terhadap Yield Xanthone dan Coumarin

Pelarut Total	Metanol:PE	Xanthone	Coumarin
10	25:75	$1,33 \pm 0,33 \%$	$1,24 \pm 0,31 \%$
	50:50	$2,13 \pm 1,04 \%$	$1,55 \pm 0,44 \%$
30	25:75	$1,71 \pm 0,02 \%$	$1,66 \pm 0,11 \%$
	50:50	$2,23 \pm 0,06 \%$	$2,08 \pm 0,14 \%$
50	25:75	$2,14 \pm 0,52 \%$	$1,98 \pm 0,52 \%$
	50:50	$2,48 \pm 0,21 \%$	$2,41 \pm 0,21 \%$
70	25:75	$3,01 \pm 0,18 \%$	$2,54 \pm 0,05 \%$
	50:50	$3,13 \pm 0,03 \%$	$2,91 \pm 0,04 \%$

Grafik diatas merupakan grafik hubungan antara pengaruh variabel perbandingan pelarut total serta variabel pelarut polar:non polar terhadap yield xanthone dan coumarin yang dihasilkan. Yield tersebut merupakan massa senyawa bioaktif yang diperoleh dari variabel per total daun kering yang

digunakan. Hasil optimum juga ditunjukkan pada variabel crude:pelarut 70 dan perbandingan metanol:petroleum eter 50:50 dengan pengaruh yang sama seperti pada recovery. Pada perbandingan tersebut diperoleh yield xanthone $3,13 \pm 0,03$ % dan yield coumarin $2,91 \pm 0,04$ %.

Dari penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa variabel yang optimum ialah pada perbandingan pelarut total 70 dengan perbandingan pelarut polar:non polar pada 50:50. Akan tetapi walaupun telah diketahui variabel tersebut merupakan variabel yang optimum, namun dengan *single extraction* kedua senyawa tersebut belum dapat dipisahkan secara sempurna. Oleh karena itu dilakukan proses pemisahan lebih lanjut, yaitu dengan *multiple extraction*.

Proses pemisahan lebih lanjut ini dilakukan hingga tahap ketiga, karena kenaikan recovery, kadar, dan yield yang tidak terlalu signifikan. Berikut merupakan tabel hasil recovery, kadar, dan yield yang diperoleh pada tahap kedua dan ketiga :

Tabel IV.5.4 Pengaruh Variabel pada Tahap Kedua terhadap Recovery, Kadar, dan Yield Xanthone dan Coumarin

Keterangan	Recovery	Kadar	Yield
Xanthone	95.32 %	15.28 %	3.16 %
Coumarin	95.56 %	14.48 %	2.99 %

Tabel IV.5.5 Pengaruh Variabel pada Tahap Ketiga terhadap Recovery, Kadar, dan Yield Xanthone dan Coumarin

Keterangan	Recovery	Kadar	Yield
Xanthone	95.56 %	15.32 %	3.17 %
Coumarin	95.99 %	14.55 %	3,01 %

Berdasarkan tabel-tabel yang terdapat diatas dapat diketahui bahwa recovery, kadar, serta yield yang dihasilkan dengan *multiple extraction* tidak menunjukkan kenaikan yang signifikan. Pada recovery misalnya, dimana setelah *single extraction* didapatkan recovery xanthone 94,43% dan recovery coumarin 92,62%. Kemudian pada *multiple extraction* tahap kedua diperoleh recovery xanthone 95,32% dan recovery coumarin 95,56%. Sementara setelah diproses hingga pemisahan

tahap ketiga dihasilkan recovery xanthone 95.56% dan recovery coumarin 95.99%.

Hal yang sama terjadi pada kadar dimana untuk kadar xanthone dan coumarin setelah diproses secara *single extraction* didapatkan hasil sebesar masing-masing 15,16% untuk xanthone dan 14,06% untuk coumarin. Lalu pada tahap kedua berturut-turut yaitu 15.28% dan 15.28%. Sedangkan pada tahap ketiga yaitu berturut-turut 15,32% untuk xanthone dan 14,55% untuk coumarin.

Sementara untuk yield yang dihasilkan setelah diproses secara *single extraction* didapatkan hasil berturut-turut sebesar 3,13% untuk xanthone dan 2,91% untuk coumarin. Pada tahap kedua sebesar 3,16% untuk xanthone dan 2,99% untuk coumarin. Kemudian pada tahap ketiga didapatkan yield masing-masing untuk xanthone dan coumarin sebesar 3,17% dan 3,01%.

Dari hasil penelitian tersebut diketahui bahwa kenaikan yang diperoleh dengan melanjutkan proses secara *multiple extraction* tidak menunjukkan perubahan yang signifikan. Oleh karena itu untuk proses pemisahan secara *multiple extraction* pun dihentikan sampai tahap ketiga.

IV.6 Analisa Pengaruh antara Variabel terhadap Hasil Penelitian

Dengan hasil yang didapatkan dari penelitian ini, maka untuk mengetahui variabel-variabel yang memiliki pengaruh paling signifikan dapat digunakan bantuan *software* Design Expert 9.0.3. Dengan bantuan *software* tersebut diharapkan dapat diketahui variabel yang memiliki pengaruh paling signifikan agar semakin mudah untuk memaksimalkan variabel respon yang diinginkan.

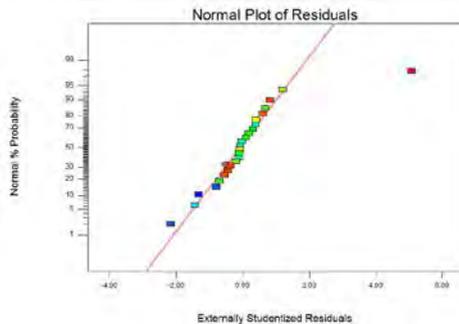
Tabel IV.6.1 Hasil Urutan Percobaan dengan Menggunakan *Software Design Expert* 9.0.3.

Run	A - Pelarut Total	B - Metanol : PE	Recovery Xanthone	Kadar Xanthone	Yield Xanthone	Recovery Coumarin	Kadar Coumarin	Yield Coumarin
1	30	25:75	50.898	8.4306	1.68924	49.0242	7.67695	1.53824
2	30	25:75	52.0145	8.51652	1.7263	56.0201	8.6717	1.75775
3	10	50:50	98.7836	16.2002	3.27851	59.7011	9.25635	1.87325
4	70	25:75	94.9072	14.4436	3.14985	79.2285	11.3994	2.48597
5	10	25:75	31.5173	5.22618	1.04602	30.1513	4.72676	0.946061
6	50	50:50	68.5874	10.544	2.27633	69.9195	10.1621	2.19388
7	10	50:50	37.9191	6.30138	1.25849	32.9385	5.17492	1.03352
8	50	25:75	70.4817	10.5705	2.3392	70.7553	10.0323	2.2201
9	50	25:75	76.1322	11.6545	2.52673	74.4294	10.7719	2.33538

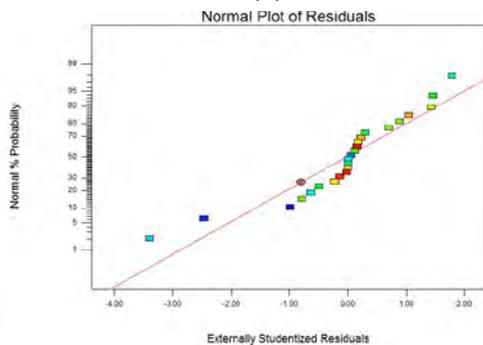
Tabel IV.6.1 Hasil Urutan Percobaan dengan Menggunakan *Software Design Expert 9.0.3.* (lanjutan)

Run	A - Pelarut Total	B - Metanol : PE	Recovery Xanthone	Kadar Xanthone	Yield Xanthone	Recovery Coumarin	Kadar Coumarin	Yield Coumarin
10	10	50:50	64.1346	10.5793	2.12855	49.2582	7.69156	1.54558
11	70	25:75	84.699	12.4542	2.81105	82.6592	11.4908	2.59361
12	70	50:50	93.4487	14.9649	3.10145	93.8431	14.2078	2.94453
13	30	50:50	65.2369	10.7886	2.16513	66.3964	10.381	2.08333
14	10	25:75	37.3124	6.1873	1.23835	37.9256	5.94571	1.19
15	30	25:75	51.5007	8.2144	1.70924	53.7869	8.11078	1.68768
16	50	50:50	81.3985	12.2801	2.70152	83.5408	11.9154	2.62127
17	70	25:75	92.7791	13.8849	3.07922	80.9584	11.4545	2.54024
18	50	50:50	74.3833	11.136	2.46869	77.1089	10.914	2.41946
19	70	50:50	95.3794	15.2453	3.16552	91.5763	13.8385	2.8734
20	30	50:50	68.6872	11.327	2.27964	61.6758	9.61561	1.93521
21	10	25:75	51.0418	8.46368	1.69401	50.0467	7.84569	1.57032
22	70	50:50	94.4716	15.2924	3.13539	92.4549	14.149	2.90097
23	30	50:50	67.5117	10.9215	2.24063	70.7434	10.8196	2.21973
24	50	25:75	46.557	7.07265	1.54517	43.9029	6.30541	1.37755

Dari data yang didapatkan selama percobaan dan dengan menggunakan bantuan *software* Design Expert, maka dilakukan uji normalitas terhadap data-data yang didapatkan. Uji normalitas tersebut dapat digunakan untuk mengetahui apakah data yang dihasilkan sudah cukup baik, juga untuk meminimalisir nilai deviasi yang besar. Ketiga jenis respon yang digunakan meliputi recovery, kadar, dan yield. Kemudian diuji normalitasnya menggunakan Design Expert sehingga didapatkan hasil sebagai berikut :

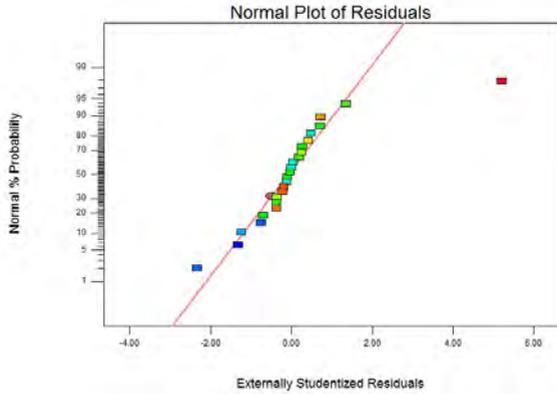


(a)

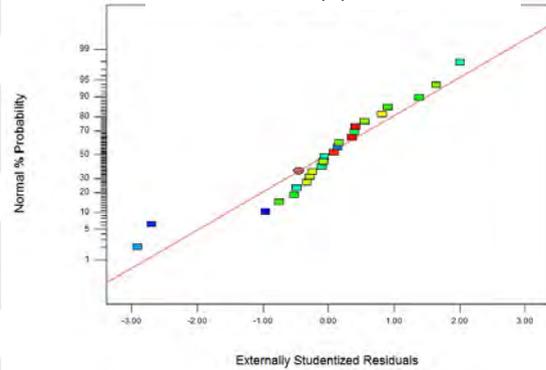


(b)

Gambar IV.6.1 Grafik Uji Normalitas Respon Recovery terhadap Variabel, (a) Xanthone, (b) Coumarin

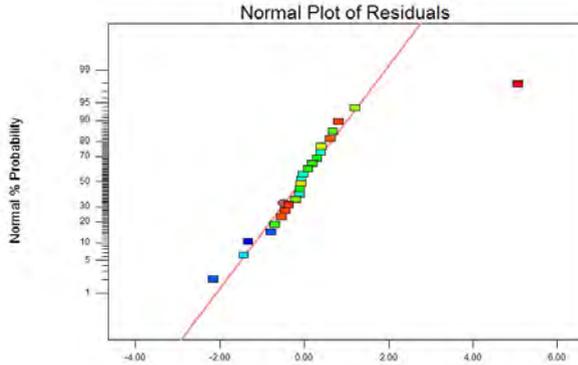


(a)

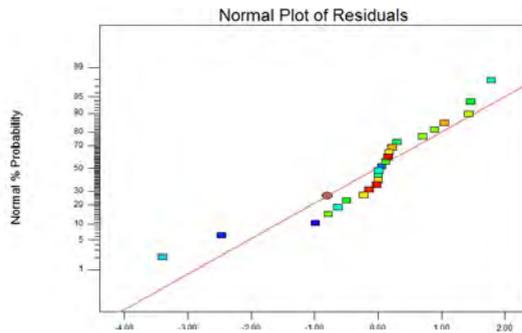


(b)

Gambar IV.6.2 Grafik Uji Normalitas Respon Kadar terhadap Variabel, (a) Xanthone, (b) Coumarin



(a)



(b)

Gambar IV.6.3 Grafik Uji Normalitas Respon Yield terhadap Variabel, (a) Xanthone, (b) Coumarin

Berdasarkan grafik diatas, ketiga jenis respon xanthone dan coumarin memiliki persebaran data yang merata disekitar garis diagonal. Hal ini menunjukkan bahwa keseluruhan data diatas memiliki distribusi yang normal. Uji normalitas digunakan untuk mengetahui kenormalan penyebaran data. Suatu data dapat dikatakan memiliki distribusi yang normal apabila data tersebut penyebarannya mengikuti garis diagonal (Warman, 2013).

Setelah kenormalan penyebaran data percobaan diketahui, selanjutnya dengan menggunakan software yang sama diidentifikasi *Analisa Of Variance* (ANOVA). ANOVA dapat digunakan untuk mengetahui variabel-variabel yang memiliki pengaruh paling signifikan untuk setiap respon yang diberikan. Dalam analisa ini, P-Value dapat diaplikasikan untuk mengetahui pengaruh variabel yang paling signifikan terhadap respon yang diberikan. Apabila nilai P-Value $< 0,05$, maka hal tersebut mengindikasikan bahwa variabel tersebut memiliki pengaruh yang signifikan (Montgomery,2005).

Response 1 Recovery Xanthone

ANOVA for selected factorial model

Analysis of variance table [Classical sum of squares - Type II]

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F	
Model	6565.99	4	1641.50	9.92	0.0002	significant
A-Pelarat Total	5360.39	3	1786.80	10.80	0.0002	
B-Metanol:PE	1205.60	1	1205.60	7.28	0.0142	
Residual	3144.74	19	165.51			
Lack of Fit	437.57	3	145.86	0.86	0.4809	not significant
Pure Error	2707.16	16	169.20			
Cor Total	9710.72	23				

Gambar IV.6.4 Hasil ANOVA Pengaruh Variabel terhadap Recovery Xanthone

Response	4	Recovery Coumarin				
ANOVA for selected factorial model						
Analysis of variance table [Classical sum of squares - Type II]						
Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value	
Model	6804.39	4	1701.10	24.47	< 0.0001	significant
<i>A-Pelarut Total</i>	5984.60	3	1994.87	28.70	< 0.0001	
<i>B-Metanol:PE</i>	819.80	1	819.80	11.79	0.0028	
Residual	1320.59	19	69.50			
<i>Lack of Fit</i>	32.14	3	10.71	0.13	0.9390	not significant
<i>Pure Error</i>	1288.44	16	80.53			
Cor Total	8124.98	23				

Gambar IV.6.5 Hasil ANOVA Pengaruh Variabel terhadap Recovery Coumarin

Gambar tersebut menunjukkan analisa pengaruh yang diberikan variabel terhadap respon recovery yang dihasilkan pada percobaan. Pada respon recovery xanthone didapatkan nilai P-Value dari variabel A dan B masing-masing sebesar 0,0002 dan 0,0142. Pada respon recovery coumarin didapatkan nilai P-Value dari variabel A dan B masing-masing sebesar < 0,0001 dan 0,0028. Sehingga dapat disimpulkan bahwa variabel A dan B memiliki pengaruh yang signifikan terhadap recovery yang dihasilkan karena nilai P-Value yang dihasilkan < 0,05.

Response 2 Kadar Xanthone

ANOVA for selected factorial model

Analysis of variance table [Classical sum of squares - Type II]

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F	
Model	146.54	4	36.63	8.89	0.0003	significant
<i>A-Pelarut Total</i>	107.87	3	35.96	8.73	0.0008	
<i>B-Metanol:PE</i>	38.66	1	38.66	9.38	0.0064	
Residual	78.29	19	4.12			
<i>Lack of Fit</i>	8.07	3	2.69	0.61	0.6166	not significant
<i>Pure Error</i>	70.22	16	4.39			
Cor Total	224.83	23				

Gambar IV.6.6 Hasil ANOVA Pengaruh Variabel terhadap Kadar Xanthone

Response 5 Kadar Coumarin

ANOVA for selected factorial model

Analysis of variance table [Classical sum of squares - Type II]

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F	
Model	132.86	4	33.22	21.54	< 0.0001	significant
<i>A-Pelarut Total</i>	109.47	3	36.49	23.66	< 0.0001	
<i>B-Metanol:PE</i>	23.39	1	23.39	15.17	0.0010	
Residual	29.30	19	1.54			
<i>Lack of Fit</i>	1.55	3	0.52	0.30	0.8269	not significant
<i>Pure Error</i>	27.75	16	1.73			
Cor Total	162.16	23				

Gambar IV.6.7 Hasil ANOVA Pengaruh Variabel terhadap Kadar Coumarin

Gambar tersebut menunjukkan analisa pengaruh yang diberikan variabel terhadap respon kadar yang dihasilkan pada percobaan. Pada respon kadar xanthone didapatkan nilai P-Value dari variabel A dan B masing-masing sebesar 0,0008 dan 0,0064. Pada respon kadar coumarin didapatkan nilai P-Value dari variabel A dan B masing-masing sebesar $< 0,0001$ dan 0,001. Sebagaimana telah disebutkan sebelumnya, bahwa suatu variabel dikatakan memiliki pengaruh yang paling signifikan apabila nilai P-Value nya $< 0,05$. Sehingga dapat disimpulkan bahwa baik variabel A dan B memiliki pengaruh yang signifikan terhadap respon kadar yang dihasilkan.

Response 3 Yield Xanthone

ANOVA for selected factorial model

Analysis of variance table [Classical sum of squares - Type II]

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F	
Model	7.23	4	1.81	9.92	0.0002	significant
A-Pelarut Total	5.90	3	1.97	10.80	0.0002	
B-Metanol:PE	1.33	1	1.33	7.28	0.0142	
Residual	3.46	19	0.18			
Lack of Fit	0.48	3	0.16	0.86	0.4809	not significant
Pure Error	2.98	16	0.19			
Cor Total	10.70	23				

Gambar IV.6.8 Hasil ANOVA Pengaruh Variabel terhadap Yield Xanthone

Response	6	Yield Coumarin				
ANOVA for selected factorial model						
Analysis of variance table [Classical sum of squares - Type II]						
Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F	
Model	6.70	4	1.67	24.47	< 0.0001	significant
A-Pelarat Total	5.89	3	1.96	28.70	< 0.0001	
B-Metanol:PE	0.81	1	0.81	11.80	0.0028	
Residual	1.30	19	0.068			
Lack of Fit	0.032	3	0.011	0.13	0.9389	not significant
Pure Error	1.27	16	0.079			
Cor Total	8.00	23				

Gambar IV.6.9 Hasil ANOVA Pengaruh Variabel terhadap Yield Coumarin

Gambar diatas menunjukkan analisa pengaruh yang diberikan variabel terhadap respon yield yang dihasilkan pada percobaan. Pada respon recovery xanthone didapatkan nilai P-Value dari variabel A dan B masing-masing sebesar 0,0002 dan 0,0142. Pada respon recovery coumarin didapatkan nilai P-Value dari variabel A dan B masing-masing sebesar < 0,0001 dan 0,0028. Sehingga dapat disimpulkan bahwa variabel A dan B memiliki pengaruh yang signifikan terhadap respon berupa yield yang dihasilkan. Hal tersebut ditunjukkan dengan P-Value masing-masing variabel yang memiliki nilai < 0,05.

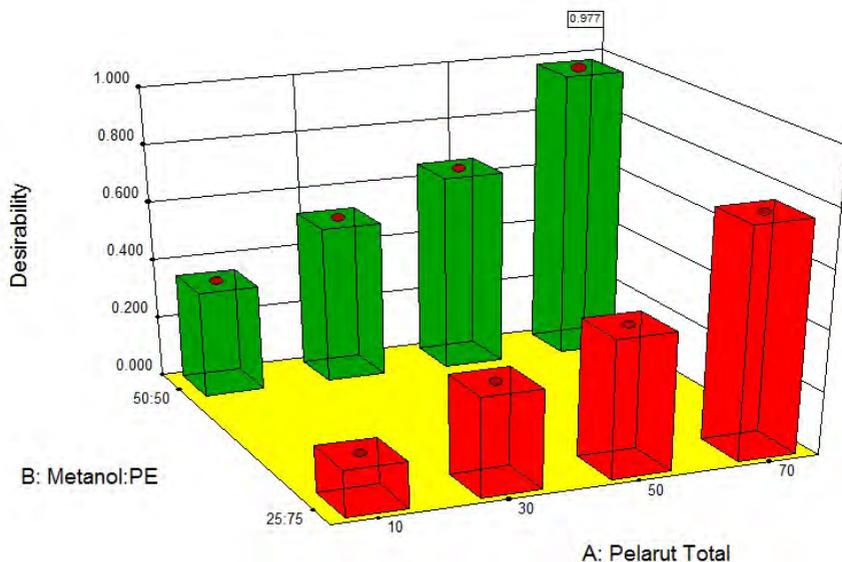
Setelah kenormalan penyebaran data percobaan diketahui, selanjutnya dengan menggunakan *software* Design Expert dapat pula diidentifikasi solusi optimasi untuk memaksimalkan seluruh respon yang dihasilkan. Untuk hasil penelitian kali ini didapatkan solusi seperti berikut :

Solutions for 8 combinations of categoric factor levels

Ilumber	Pelarut Total	Metanol/PE	Recovery	Xanthone	Kadar	Xanthone	Yield	Xanthone	Recovery	Coumarin	Kadar	Coumarin	Yield	Coumarin	Desirability
1	70	<u>50:50</u>	<u>98.702</u>	<u>15.650</u>	<u>3.309</u>	<u>92.631</u>	<u>13.744</u>	<u>2.907</u>	<u>0.977</u>						
2	70	25:75	85.527	13.112	2.839	80.942	11.769	2.540	0.776						
3	50	50:50	76.678	11.812	2.545	75.787	11.004	2.378	0.672						
4	30	50:50	66.396	10.969	2.204	65.452	10.200	2.054	0.541						
5	50	25:75	62.502	9.274	2.074	64.098	9.030	2.011	0.465						
6	10	50:50	60.539	10.096	2.009	49.181	7.761	1.543	0.365						
7	30	25:75	52.221	8.431	1.733	53.763	8.225	1.687	0.395						
8	10	25:75	46.364	7.557	1.539	37.492	5.786	1.176	0.158						

8 Solutions found

Gambar IV.6.10 Solusi Optimal untuk Seluruh Respon yang Dihasilkan



Gambar IV.6.11 Hasil Optimisasi Variabel dari Design Expert

Dari hasil tersebut maka diketahui variabel yang dapat digunakan untuk mengoptimalkan hasil yang didapatkan dengan menggunakan *software* Design Expert. Dari grafik *optimization plot* tersebut, didapatkan bahwa variabel yang dapat digunakan untuk menghasilkan produk yang optimum adalah variabel perbandingan pelarut total 70 dengan variabel perbandingan pelarut polar:nonpolar 50:50. Hal ini memperkuat analisa yang sudah disebutkan sebelumnya bahwa hasil optimum didapatkan pada saat perbandingan pelarut total 70 dan perbandingan pelarut polar:nonpolar 50:50.

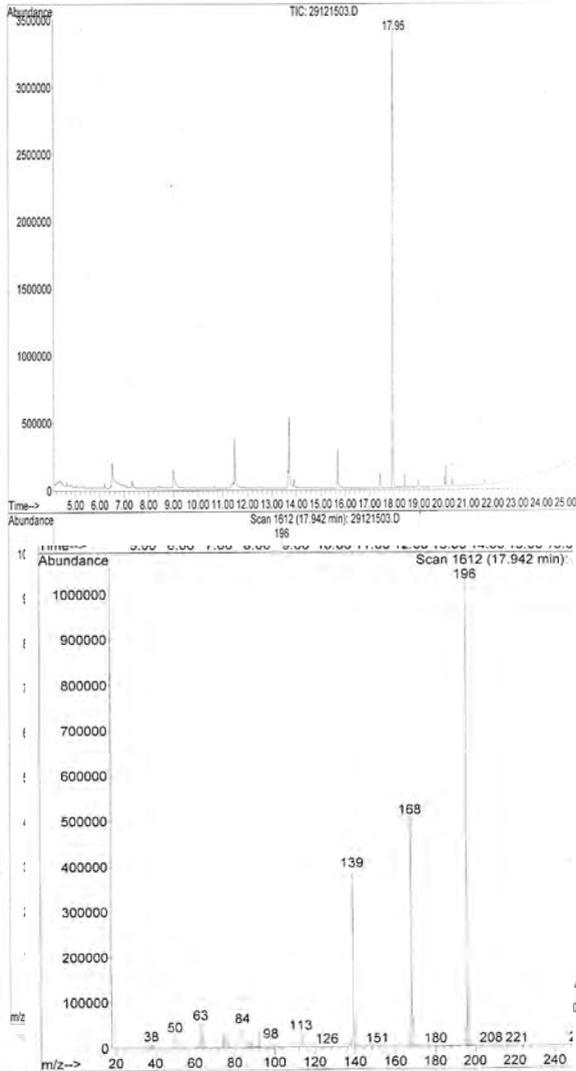
Dari kurva kalibrasi yang dihasilkan dari berbagai konsentrasi tersebut, kemudian hasil pengukuran absorbansi sampel-sampel yang tersedia dimasukkan kedalam persamaan yang ada pada kurva kalibrasi untuk mengetahui konsentrasi masing-masing sampel. Setelah konsentrasi masing-masing sampel diketahui, selanjutnya dilakukan perhitungan untuk

menghitung recovery, kadar, dan yield setiap sampel untuk semua variabel. Sehingga dari hasil perhitungan tersebut, dapat dibuat sebuah grafik yang memperlihatkan hubungan antara respon yang dihasilkan dengan variabel yang digunakan.

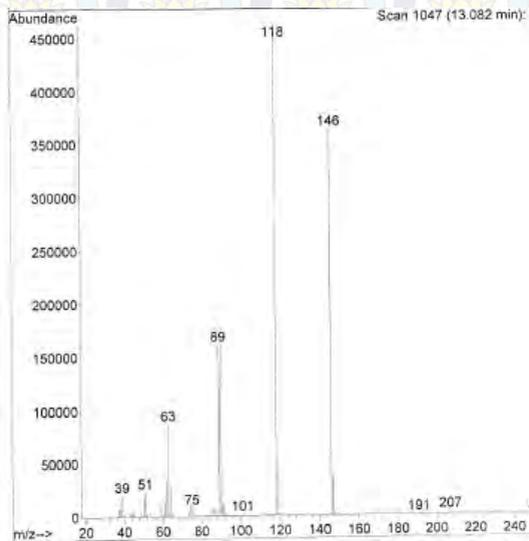
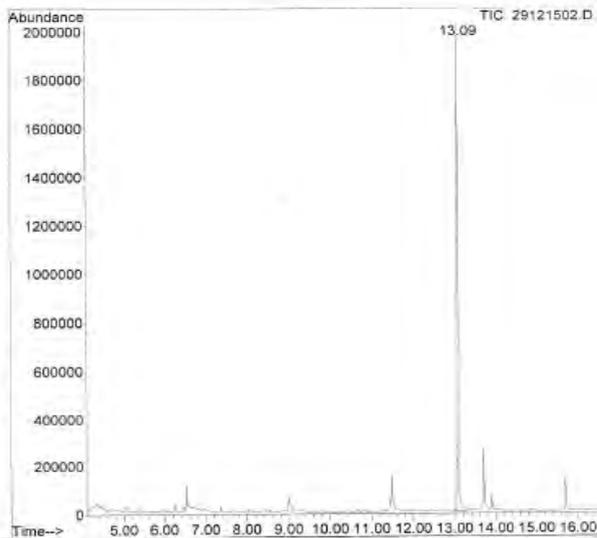
IV.7 Hasil Analisa Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS)

Untuk memperkuat hasil analisa kualitatif yang telah dilakukan dengan uji menggunakan *Thin Layer Chromatography* (TLC), maka dilakukan pula analisa dengan menggunakan GC-MS untuk mengetahui senyawa apa saja yang terkandung dalam fraksi polar dan fraksi non polar dari ekstrak daun nyamplung.

Berdasarkan hasil analisa TLC, pada sampel fraksi polar dan non polar terdapat spot yang sama dengan spot larutan standar xanthone dan kumarin. Untuk membuktikan hal tersebut, maka dilakukan analisa GC-MS untuk mengetahui kandungan senyawa yang terdapat pada fraksi polar dan non polar khususnya, senyawa kumarin dan xanthone. Agar hasil yang didapatkan lebih akurat, terlebih dahulu dilakukan analisa GC-MS untuk larutan standart xanthone dan coumarin yang akan digunakan untuk menganalisa sampel sehingga dapat diketahui keakuratan dari data yang dihasilkan. Berikut merupakan hasil analisa GC-MS untuk larutan standart xanthone dan coumarin :

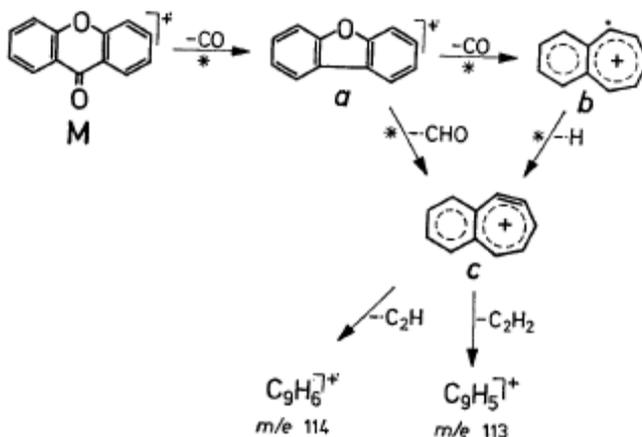


Gambar IV.7.1 Hasil Analisa GC-MS untuk Larutan Standart Xanthone



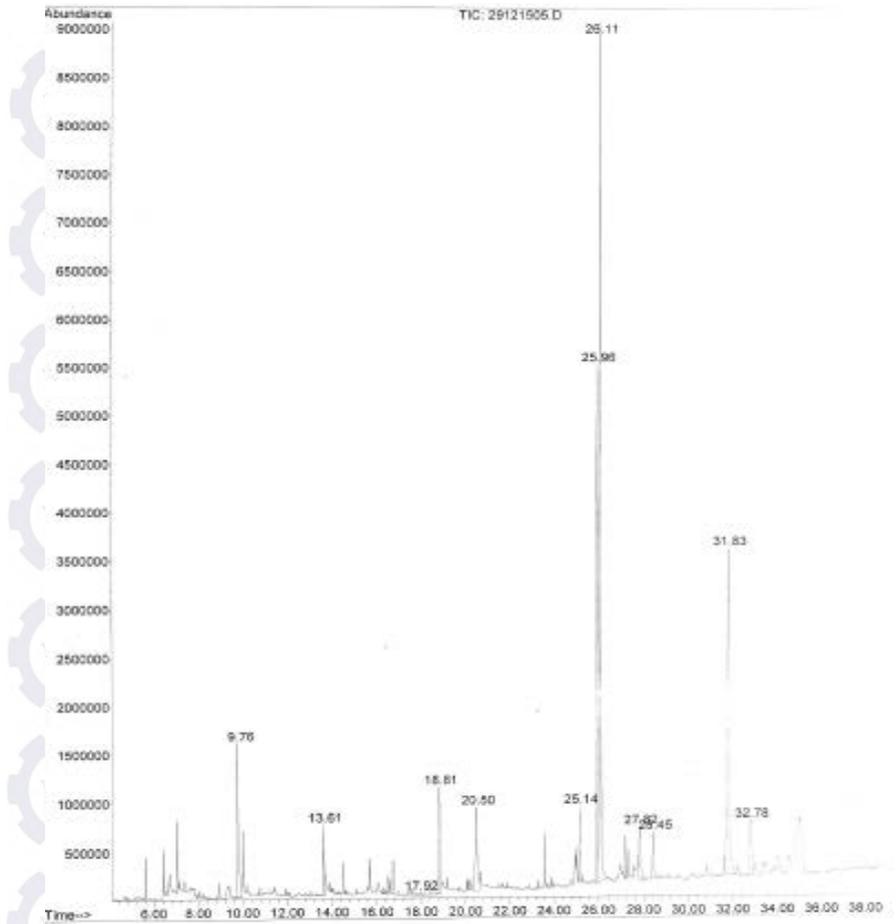
Gambar IV.7.2 Hasil Analisa GC-MS untuk Larutan Standart Coumarin

Dari hasil analisa tersebut diketahui bahwa *retention time* untuk masing-masing senyawa xanthone dan coumarin pada larutan standart berturut-turut ialah 17,95 menit dan 13,08 menit. Untuk ciri khas peak dari senyawa xanthone terdeteksi muncul pada 196, 168, 139, 113, 98, 84, 63, 50, dan 38 m/z. Sementara itu untuk ciri khas peak dari senyawa coumarin terdeteksi muncul pada 146, 118, 89, 63, 51, dan 39 m/z. Fragmentasi yang diperkirakan terjadi pada senyawa xanthone ditunjukkan pada gambar sebagai berikut :

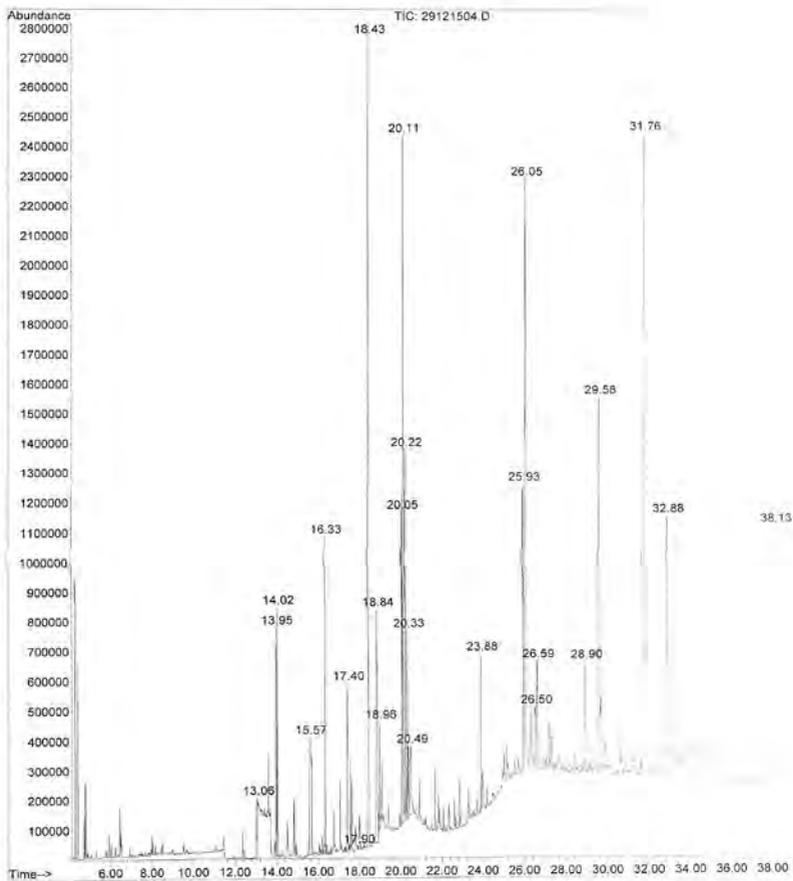


Gambar IV.7.3 Fragmentasi pada Senyawa Xanthone

Berikut merupakan hasil analisa GC-MS untuk fraksi polar dan non polar dari ekstrak daun nyamplung :



Gambar IV.7.4 Hasil Analisa GC-MS Fraksi Polar Ekstrak Daun Nyamplung



Gambar IV.7.5 Hasil Analisa GC-MS Fraksi Non Polar Ekstrak Daun Nyamplung

Berdasarkan gambar diatas dapat dilihat bahwa terdapat peak-peak yang teridentifikasi sebagai senyawa apa saja yang berada dalam ekstrak polar dan non polar dari ekstrak daun nyamplung. Sedangkan pada tabel berikut dapat diketahui senyawa apa saja yang terdapat dalam fraksi polar dan non polar dari ekstrak daun nyamplung.

Tabel IV.7.1 Daftar Komponen dalam Fraksi Polar yang Teridentifikasi dengan GC-MS

Peak	R. T (min)	Component	% Area	Quality
1	9,76	1,2 - Benzenediol	7,23	91
2	13,61	Acetic Acid	1,54	47
3	17,92	Xanthone	0,056	94
4	18,81	Hexadecanoic Acid	3,547	99
5	20,5	9, 12, 15v - Octadecatrien - 1-ol	4,086	94
6	25,14	Bis(trimethylsilyl) Mercury	1,53	50
7	25,96	trans-2-[2-(Trifluoromethyl)phenyl] - 10b	11,24	64
8	26,11	trans-2-[2-(Trifluoromethyl)phenyl] - 10b, 10c-dimethyl-10b,10c-dihydropyrene	23,27	64
9	27,82	2, 4, 11 - Trimethoxy - 1H - cyclopent[b] antrache	1,92	64
10	28,45	[4] (1 - 1') [4] (3 - 3') Ferrocenophane - 6, 7, 12 - trione	1,57	59
11	31,83	3 - Aza - B - homo - 5. alpha. - cholestan - 4 - one	19,69	72
12	32,78	Cholest - 3 - en - 6 - ol, (5. alpha.) -	3,37	72

Tabel IV.7.2 Daftar Komponen dalam Fraksi Non Polar yang Teridentifikasi dengan GC-MS

Peak	R. T (min)	Component	% Area	Quality
1	13,06	Cycloheptasiloxane, tetradecamethyl -	0,98	60

Tabel IV.7.2 Daftar Komponen dalam Fraksi Non Polar yang Teridentifikasi dengan GC-MS (lanjutan)

Peak	R. T (min)	Component	% Area	Quality
2	13,95	Phenol, 2, 6 - bis (1, 1 - dimethylethyl) - 4 -methyl -	1,49	96
3	14,02	Dodecanoic acid, methyl ester	1,51	97
4	15,57	Silane, [[4 - [1, 2 - bis [(trimethylsilyl) oxy] ethyl] - 1, 2 - phenylene] bis (oxy)] bis [trimethyl -]	2,77	83
5	16,33	Tetradecanoic acid, methyl ester	2,19	98
6	17,4	Cyclononasiloxane, octadecamethyl -	1,48	90
7	17,9	Xanthone	0,02	15
8	18,43	Hexadecanoic acid, methyl ester	6,81	99
9	18,84	n - Hexadecanoic acid	3,59	99
10	18,96	Cyclododecasiloxane, eicosamethyl -	0,89	90
11	20,05	9, 12 - Octadecadienoic acid, methyl ester	2,39	99
12	20,11	9, 12, 15 - Octadecatrienoic acid, methyl ester, (Z, Z, Z) -	6,36	98
13	20,22	Phytol	2,62	87
14	20,33	Octadecaic acid, methyl ester	1,35	99
15	20,49	n - Hexadecanoic acid	1,18	95
16	23,88	1, 2 - Benzenedicarboxylic acid, diisooctyl ester	1,15	83
17	25,93	trans - 2 - [2 - (Trifluoromethyl) phenyl] - 10b, 10c - dimethyl - 10b, 10c - dihydropyrene	2,53	72
18	26,05	trans - 2 - [2 - (Trifluoromethyl) phenyl] - 10b, 10c - dimethyl	8,39	64

Tabel IV.7.2 Daftar Komponen dalam Fraksi Non Polar yang Teridentifikasi dengan GC-MS (lanjutan)

Peak	R. T (min)	Component	% Area	Quality
19	26,5	(+) - (P, 1R, 3S) - 5 - (4, 5 - dimethoxy - 2 - methyl - 1 - naphthyl) - 6, 8 - dimethoxy - 1, 2, 3, - trimethyl - 1, 2, 3, 4 - tetrahydroisoquinoline [(+) - O - Methylancistrocline]	0,97	56
20	26,59	Tetratriacontane, 17 - hexadecyl -	1,13	53
21	28,9	Eicosane	1,76	98
22	29,58	Vitamin E	6,09	99
23	31,76	1 - Phenyl - 3 - methyl - 5 - (ethoxycarbonyl) - 7 - [(4 - methylphenyl)amino] pyrazolo [3, 4 - d] [1, 3] diazepine	16,65	72
24	32,88	(23S) - ethylcholest - 5 - en - 3. beta. - ol	5,27	98
25	38,13	Friedelin	7,92	99

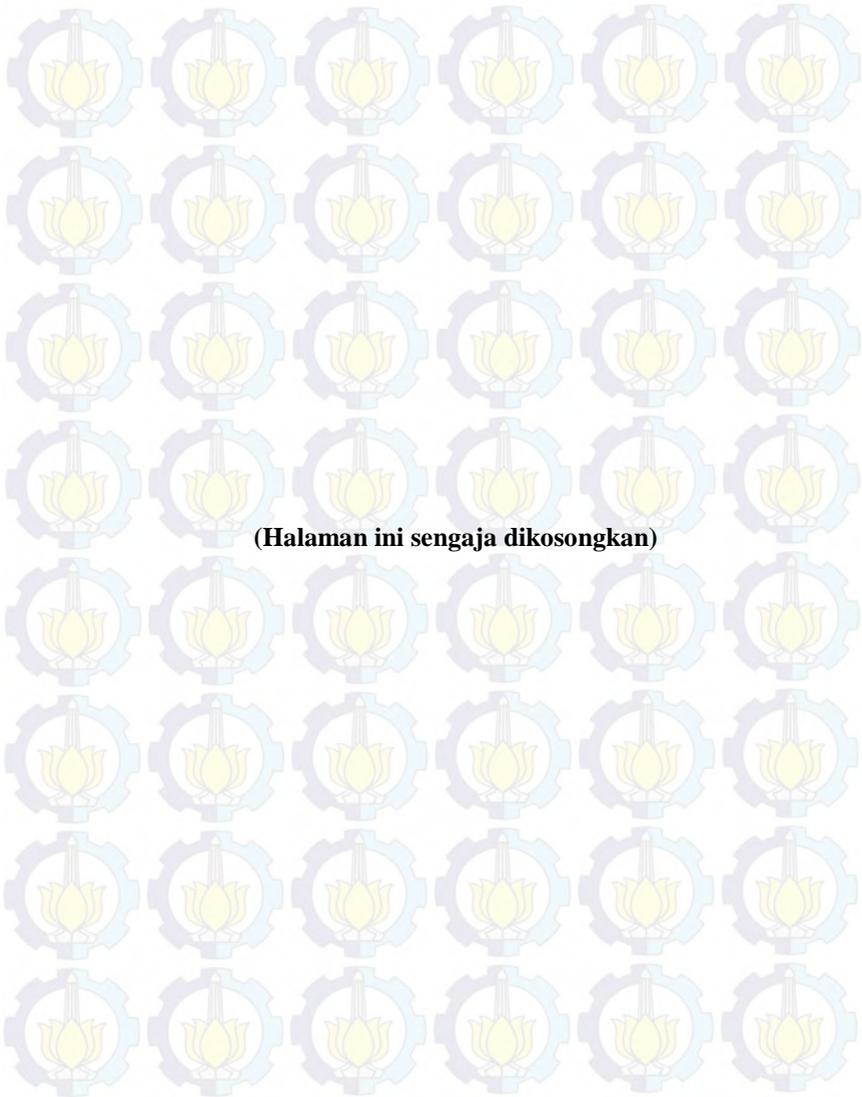
Secara kualitatif, untuk mengetahui senyawa coumarin yang terdapat dalam fraksi polar dan non polar daun nyamplung masih belum dapat diketahui dengan metode GC-MS. Hal ini dapat disebabkan oleh penggunaan kolom yang kurang cocok dan kondisi operasi yang digunakan untuk analisa kurang tepat. Dimana kolom HP5 yang digunakan memiliki spesifikasi temperature limit dari -60°C hingga 325°C. Sedangkan titik didih dari coumarin 301°C dan xanthone 351°C. Untuk kondisi operasi GC-MS, suhu injector diatur pada suhu 250°C. Kemudian suhu dinaikkan 20°C/menit hingga suhu 100°C, lalu dinaikkan 50°C/menit hingga suhu 290°C untuk kemudian dijaga agar tetap pada suhu tersebut selama 10 menit. Suhu tersebut belum

mencapai titik didih dari coumarin dan xanthone. Sehingga untuk selanjutnya dibutuhkan kolom yang dapat digunakan untuk kondisi operasi yang lebih tinggi untuk analisa xanthone dan coumarin.

Seperti telah diketahui sebelumnya jika salah satu tujuan dari penelitian ini adalah untuk memisahkan senyawa xanthone dan coumarin yang terdapat dalam fraksi polar ekstrak daun nyamplung. Dimana gagasan dari tujuan ini muncul karena gugus rantai karbon dari senyawa coumarin lebih pendek dibandingkan dengan senyawa xanthone. Sehingga dapat diketahui bahwa senyawa coumarin bersifat lebih polar dibandingkan dengan senyawa xanthone. Maka diharapkan senyawa coumarin dapat terikut lebih banyak ke fraksi polar ekstrak daun nyamplung, sementara untuk senyawa xanthone dapat terikut lebih banyak ke fraksi non polar dari ekstrak daun nyamplung.

Akan tetapi dari hasil penelitian yang telah dilakukan dapat diketahui bahwa hasil yang diharapkan tidak sesuai dengan tujuan tersebut. Dimana pada fraksi polar ekstrak daun nyamplung masih terdeteksi adanya senyawa xanthone dan coumarin. Hasil tersebut dapat dilihat pada hasil analisa menggunakan Thin Layer Chromatography (TLC) dimana analisa tersebut menggunakan larutan standart senyawa xanthone dan coumarin untuk perbandingan ketinggiannya. Sedangkan dari hasil analisa menggunakan *Gas Chromatography-Mass Spectrometry* (GC-MS) terdeteksi adanya senyawa xanthone, namun senyawa coumarin tidak terdeteksi. Hal ini dapat disebabkan oleh beberapa faktor, antara lain karena terjadinya *overlapping* dengan peak lain yang muncul berdekatan dengan senyawa coumarin dan kemungkinan metode separasi yang kurang optimal.

Sehingga untuk penelitian berikutnya diharapkan dapat ditemukan kondisi pemisahan dari senyawa xanthone dan coumarin yang terdapat dalam fraksi polar ekstrak daun nyamplung yang lebih optimal.



(Halaman ini sengaja dikosongkan)

DAFTAR PUSTAKA

- Adzkie, Devi. 2015. "Pemisahan dan Pemurnian *Bioactive Compound* dari Fraksi Polar Daun Nyamplung (*Calophyllum inophyllum*)". Surabaya : Institut Teknologi Sepuluh Nopember
- Anwar, C. dan Gunawan, H. 2007. "Peranan Ekologis dan Sosial Ekonomis Hutan Mangrove dalam Mendukung Pembangunan Wilayah Pesisir". Bogor : Pusat Litbang dan Konservasi Alam.
- CechinelFilho, V., Junior, I.F.S., Zacchino, S.A., Lima, J.C.S., and Martins, DTO., 2009. *Antimicrobial screening of some medicinal plants from Mato Grosso Cerrado*. Brazilian Journal of Pharmacognory 19 (1B): 242-248
- Dweck, A. C., and Meadows, T. 2002. "Tamanu (*Calophyllum Inophyllum*)- the African, Asian, Polynesian, and Pacific Panacea". USA : International Journal of Cosmetic Science.
- Fessenden, J. R.. 1986. "Kimia Organik Edisi Ketiga Jilid 1". Jakarta: Erlangga.
- Fessenden, J. R., Fessenden, J. S., and Feist, P. 2001. "Organic Laboratory Techniques 3rd Edition". New York : Brooks/Cole Thompson Learning. Page 13.1-13.8
- Friday, J.B., and Okano, D., 2006.*Calophyllum inophyllum (kamani)*.Species Profiles for Pacific Island Argoforestry
- Heyne, K. 1987. "Tumbuhan Berguna Indonesia Jilid 3". Jakarta : Departemen Kehutanan.
- Hitachi. 2014. "HPLC Basic Course, Principle and System Configuration Of HPLC". http://www.hitachi-hitec.com/global/science/lc/lc_basic_3.html Diakses pada 18 Oktober 2015 pukul 19.45 WIB.

<http://www.chem.umass.edu/~samal/269/tlc.pdf>. “Thin Layer Chromatography” Diakses pada 18 Oktober 2015 pukul 19.45 WIB.

Iskandari, A. 2010. “Isolasi dan Elusidasi Struktur Quercetrin dari Daun Nyamplung”. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Sebelas Maret Surakarta.

Indrakumar, Isaivani., Selvi, V., Gomathi, R., Karpagam, S.. 2012. “Phytochemical Analysis of Leaf Extracts of *Calophyllum inophyllum* L. And *Cananga odorata* (Lam.) Hook. F. & Thomson.” IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences Vol 3, 35-37.

Kristanti, A. N. Dkk. 2008. “Buku Ajar Fitokimia Laboratorium Kimia Organik Jurusan Kimia-FMIPA, UNAIR.” Surabaya : Airlangga University Press.

Laure, F. et al. 2008. “Screening of Anti-HIV Inophyllums by HPLC-DAD of *Calophyllum Inophyllum* Leaf Extracts From French Polynesia Islands”. *Analytica Chimica Acta*, Vol 624, 147-153.

Lim, T. K. 2012. “Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants”. New York : Springer

Montgomery, D.C., 2005. “Design and Analysis of Experiments 6th Edition”. New York : John Wiley and Sons, Page 96.

Murray, R.D.H., et al. 1982. “The Natural Cumarins”. New York : John Wiley and Sons.

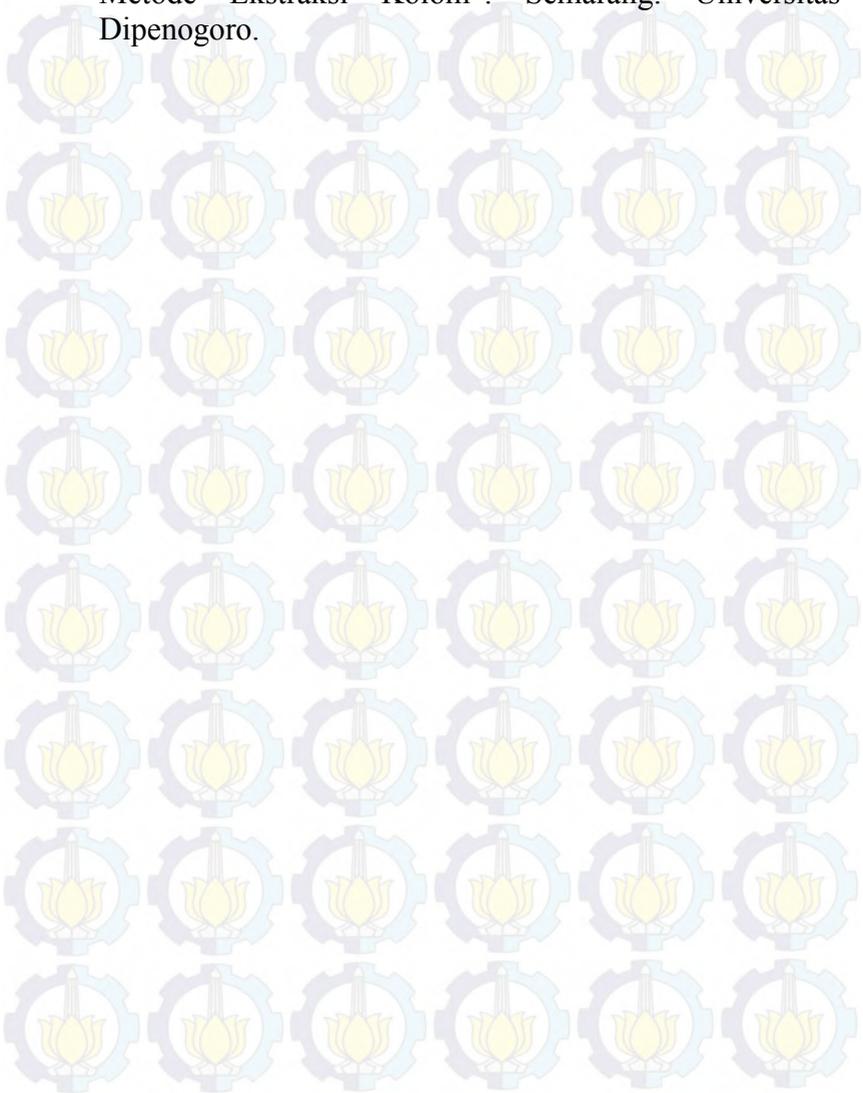
Ong, H.C. 2014. “Optimization of Biodiesel Production and Engine Performance From High Free Fatty Acid *Calophyllum Inophyllum* Oil in CI Diesel Engine”. *Science Direct*. 30-40.

Pawar, K. D. et al. 2007. “Pattern of Anti-HIV Dypyranocoumarin Expression in Callus Cultures of

- Calophyllum Inophyllum Linn". Journal of Biotechnology. Vol 130, 346-353.
- Prasad, Janki., Shrivastava, Atul., Khanna, A.K., Bhatia, G., Awasthi, S.K., Narender, T.. 2012. "Antidyslipidemic and antioxidant activity of the constituents isolated from the leaves of *Calophyllum inophyllum*." Phytomedicine Vol 19, 1245-1249.
- Praveena, Rani, Swaroopa, Veeresham, 2013. "Phytochemical Investigation of *Calophyllum Inophyllum Linn*". Natural Products Chemistry & Research, Volume 1, Issue 4.
- Preto, J.B., Cechinel-Filho, Valdir., Noldin, V.F., Sartori, Mara R.K., Isaias, Daniela E.B., Cruz, A.B.. 2004. "Antimicrobial Activity of Fractions and Compounds from *Calophyllum brasiliense* (Clusiaceae/Guttiferae)." Z. Naturforsch, 657-662.
- Ramakhrisnan, N. And Malarvizhi, P. 2011. "GC-MS Analysis of Biologically Active Compounds in Leaves Of *Calophyllum Inophyllum L*". International Journal of Chemtech Research. Vol 3 (2), 806-809.
- Robinson, T. 1995. "Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi". Bandung : ITB.
- Sadek, P.. 2002. "The HPLC Solvent Guide". United States of America: Wiley of Interscience.
- Saleh, N. M., Sanagi, M. M.. 2009. " Comparison of Pressurized Liquid Extraction with Soxhlet Extraction in the Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Soil". The Malaysian Journal of Analytical Sciences, Vol 13 No 1, 141-145.
- Sasidharan, S., Chen, Y., Saravanan, D., Sundram, K. M., Latha, L. Y.. 2011. "Extraction, Isolation, and Characterization of Bioactive Compounds from Plants'

- Extract". Afr J Tradit Complement Altern Med, 8(1), 1-10.
- Sigma-Aldrich. 2015. "Wavelength Index." <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/cell-biology/detection/learning-center/wavelength-index.html>. Diakses pada 30 Oktober 2015.
- Su, X.H., Zhang, M.L., Li, L.G., Huo, C.H., Gu, Y.C. 2008. "Chemical constituent of the plants of the genus *Calophyllum*." Chemistry & Biodiversity (5), 2579-2608.
- Sudrajat. 2009. "A Potential Plant For Biodiesel". Indonesia : Departemen Kehutanan.
- Shih-Chang, Tsai, Liang, Yu-Hsin, Chiang, Jo-Hua, et al. 2012. "Anti-inflammatory Effects of *Calophyllum inophyllum* L. In RAW 264,7 Cells".
- Stevens P. F. 1980. "A Revision of the Old World Species of *Calophyllum* (Guttiferae). J. Arnold Arbor. Vol 61, 117-699.
- Thengane S. R. et al. 2006. "Micropropagation of Indian Laurel (*Calophyllum inophyllum*), a Source of Anti-HIC Compound". Research Communications.
- Wong, B.Y., Tan, C.P., and Ho, C.W. 2013. "Effect of solid-to-solvent ratio on phenolic content and antioxidant capacities of "*Dukung Anak*" (*Phyllanthus niruri*)". International Food Research Journal, Vol 20 (1), 325-330.
- Yimdjo, M.C., Azebaze A.G., Nkengfack A.E., Meyer, A.M., Bodo, B., and Fomum, Z.T., 2004. *Antimicrobial and Cytotoxic Agents from Calophyllum inophyllum*. Phytochemistry Vol 65, 2789-2795
- Wibowo, S. dan Hendra, D. 2011. "Manfaat Tanaman Nyamplung dan Prospek Pengembangannya". Sumatera : Balai Penelitian Kehutanan.

Yunitasari, E.P., 2008. “Pengaruh Jenis Solvent dan Variasi Tray pada Pengambilan Minyak Nyamplung dengan Metode Ekstraksi Kolom”. Semarang: Universitas Diponegoro.



BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

V.1 Kesimpulan

Dari hasil penelitian dan hasil analisa yang telah dilakukan maka dapat diambil kesimpulan sebagai berikut :

1. Berbagai senyawa bioaktif dapat teridentifikasi dari ekstrak daun nyamplung, salah satunya merupakan xanthone yang terdapat dalam fraksi polar dan non polar.
2. Proses pemisahan xanthone dan coumarin dari ekstrak daun nyamplung yang dilakukan dengan metode *multiple extraction* sudah cukup maksimal.
3. Kondisi proses pemisahan xanthone dan coumarin yang optimum terjadi pada variabel pelarut total 70 (g/g) dengan perbandingan pelarut polar:non polar sebesar 50:50(g/g). Dimana proses tersebut dilakukan secara *multiple extraction* hingga tahap ketiga. Hasil perhitungan kadar, yield, dan recovery untuk senyawa xanthone pada variabel tersebut masing-masing yaitu 15.32 %, 3.17 %, dan 95.56 %. Sedangkan untuk senyawa coumarin hasil perhitungan kadar, yield, dan recovery masing-masing yaitu sebesar 14.55 %, 3.01 %, dan 95.99 %.

V.2 Saran

Saran yang dapat diambil dari hasil penelitian ini ialah :

1. Mencari alternatif metode pemisahan yang lain untuk memisahkan senyawa xanthone dan coumarin yang terdapat dalam ekstrak daun nyamplung.
2. Mencari kolom dan kondisi yang tepat agar analisa GC-MS dapat dilakukan lebih optimal.

BIODATA PENULIS 1



Reinaldi Ismawan, lahir di Banyuwangi pada 19 Februari 1993, merupakan putra tunggal dari pasangan Bapak Antonius.I dan Ibu Pipin.S . Penulis menempuh pendidikan formal dari SD, SMP dan SMA di Santa Ursula BSD, Tangerang Selatan.

Penulis melanjutkan studi di Jurusan Teknik Kimia FTI-ITS untuk jenjang Strata I. Pada akhir studi, penulis mengerjakan Tugas Pra Desain “**Pabrik Garam Beryodium dengan Proses Pencucian**”. Penulis melakukan Tugas Akhir di Laboratorium Teknologi Biokimia di bawah bimbingan bimbingan Prof. Dr. Ir.Tri Widjaja, M.Eng dan Setiyo gunawan, S.T., Ph. D. Dengan penulisan skripsi ini, penulis berharap agar buku skripsi ini bermanfaat bagi kemajuan ilmu pengetahuan dan teknologi.

Untuk menghubungi penulis dapat melalui alat email berikut : reinaldism19@yahoo.com

BIODATA PENULIS 2



Violita Anggraeni, lahir di Surabaya tanggal 12 Maret 1992, merupakan putri pertama dari empat bersaudara dari pasangan Bapak Suratno dan Ibu Raheni. Penulis menempuh pendidikan formal dari SDN Kertajaya Surabaya, SMP Negeri 1 Surabaya, dan SMA Negeri 1 Surabaya.

Setelah lulus dari SMA, penulis melanjutkan studi Diploma di Jurusan D3 Teknik Kimia FTI-ITS lalu melanjutkan jenjang Strata I di Jurusan Teknik Kimia FTI-ITS. Pada akhir masa studi, penulis mengerjakan Tugas Pra Desain “**Pabrik Garam Beryodium dengan Proses Pencucian**”. Penulis melakukan Tugas Akhir di Laboratorium Teknologi Biokimia di bawah bimbingan Prof. Dr. Ir.Tri Widjaja, M.Eng dan Setiyo gunawan, S.T., Ph. D. Dengan penulisan skripsi ini, penulis berharap agar buku skripsi ini bermanfaat bagi kemajuan ilmu pengetahuan dan teknologi.

Untuk menghubungi penulis dapat melalui alat email berikut : violitaa9@gmail.com

APPENDIKS

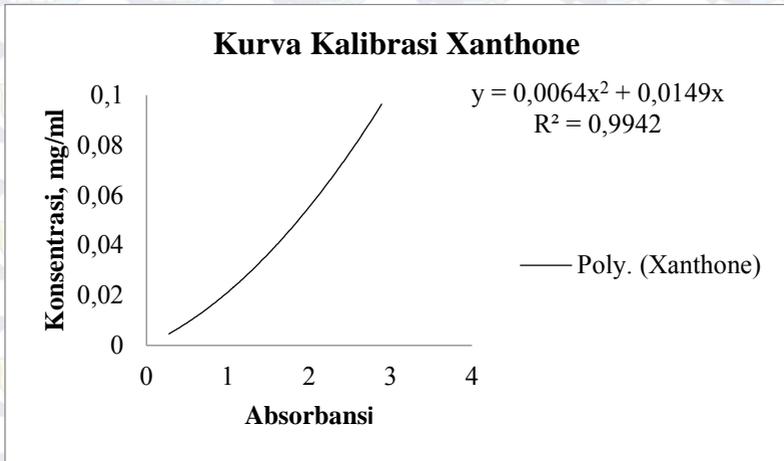
A.1 Kurva Kalibrasi

Pengukuran absorbansi senyawa yang didapatkan dari hasil pembacaan dengan menggunakan *Spectrofotometry UV-Vis*.

A.1.1 Xanthone

Tabel A.1.1 Absorbansi Xanthone pada berbagai konsentrasi dengan $\lambda=332$ nm

Waktu (detik)	Konsentrasi Xanthone (mg/ml)					
	0.1	0.08	0.06	0.03	0.01	0.005
0:00	2.89	2.614	2.203	1.211	0.461	0.277
0:10	2.892	2.61	2.204	1.212	0.461	0.278
0:20	2.893	2.612	2.207	1.212	0.461	0.277
0:30	2.892	2.608	2.204	1.213	0.461	0.277
AVERAGE	2.892	2.611	2.205	1.212	0.461	0.277

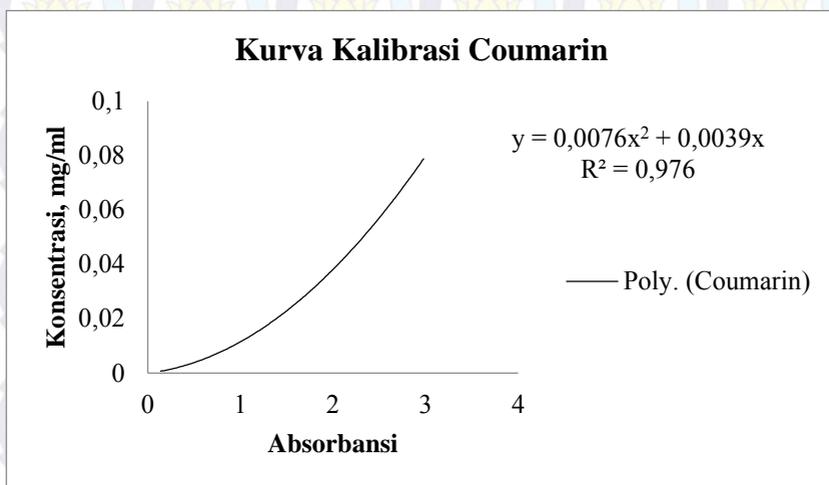


Gambar A.1.1 Kurva Kalibrasi Xanthone

A.1.2 Coumarin

Tabel A.1.2 Absorbansi Coumarin pada berbagai konsentrasi dengan $\lambda=308$ nm

Waktu (detik)	Konsentrasi Coumarin (mg/ml)					
	0.08	0.06	0.03	0.01	0.005	0.001
0:00	2.979	2.626	1.455	1.265	0.645	0.139
0:10	2.981	2.625	1.455	1.265	0.645	0.139
0:20	2.978	2.625	1.455	1.265	0.646	0.139
0:30	2.98	2.626	1.455	1.266	0.647	0.138
AVERAGE	2.980	2.626	1.455	1.265	0.646	0.139



Gambar A.1.2 Kurva Kalibrasi Coumarin

A.2 Perhitungan Konsentrasi

A.2.1 Xanthone

λ maksimum xanthone = 332 nm

Dari kurva kalibrasi xanthone, didapatkan persamaan : $y = 0,0064x^2 + 0,0149x$

Untuk menghitung konsentrasi pada variabel pelarut total 10 dengan perbandingan pelarut polar:non polar = 25:75, yaitu :

Absorbansi xanthone sampel = 2,1898
 maka didapatkan konsentrasi kuvet (M2) sebagai berikut :

$$y = 0,0064x^2 + 0,0149x$$

$$y = 0,0064 (2,1898)^2 + 0,0149 (2,1898)$$

$$y = 0,0633 \text{ mg/ml}$$

Volume pengenceran sampel (V2) = 25,1 ml

Volume sampel awal (V1) = 0,1 ml

$$\text{Konsentrasi Sampel (M1)} = \frac{M_2 \times V_2}{V_1}$$

$$= \frac{0,0633 \times 25,1}{0,1} = 15,8927 \text{ mg/ml}$$

Tabel A.2.1.1 Hasil Perhitungan Konsentrasi Xanthone dengan Variabel Pelarut Total 10

Keterangan	25 : 75				50 : 50			
	Run 1	Run 2	Run 3	Rata-Rata	Run 1	Run 2	Run 3	Rata-Rata
Absorbansi	2.91	2.42	2.61	2.43	2.90	1.51	2.13	2.14
Konsentrasi kuvet (M2), mg/ml	0.1	0.07	0.08	0.07	0.09	0.04	0.05	0.06
Konsentrasi Sampel (M1), mg/ml	15.9	17.9	24.8	19.6	24.7	8.9	14.1	15.9

Tabel A.2.1.2 Hasil Perhitungan Konsentrasi Xanthone dengan Variabel Pelarut Total 30

Keterangan	25 : 75				50 : 50			
	Run 1	Run 2	Run 3	Rata-Rata	Run 1	Run 2	Run 3	Rata-Rata
Absorbansi	1.65	1.67	1.66	1.66	1.14	1.19	1.14	1.158
Konsentrasi kuvet (M2), mg/ml	0.04	0.04 3	0.04 2	0.042	0.02 5	0.02 7	0.02 5	0.026
Konsentrasi Sampel (M1), mg/ml	8.47	8.55	8.53	8.52	5.09	5.38	5.11	5.19

Tabel A.2.1.3 Hasil Perhitungan Konsentrasi Xanthone dengan Variabel Pelarut Total 50

Keterangan	25 : 75				50 : 50			
	Run 1	Run 2	Run 3	Rata-Rata	Run 1	Run 2	Run 3	Rata-Rata
Absorbansi	2.26	2.37	1.69	2.11	1.35	1.52	1.43	1.43
Konsentrasi kuvet (M2), mg/ml	0.066	0.071	0.044	0.060	0.032	0.037	0.034	0.034
Konsentrasi Sampel (M1), mg/ml	6.69	7.18	4.42	6.09	3.20	3.77	3.47	3.48

Tabel A.2.1.4 Hasil Perhitungan Konsentrasi Xanthone dengan Variabel Pelarut Total 70

Keterangan	25 : 75				50 : 50			
	Run 1	Run 2	Run 3	Rata-Rata	Run 1	Run 2	Run 3	Rata-Rata
Absorbansi	2.16	2.01	2.13	2.10	1.30	1.32	1.31	1.334
Konsentrasi kuvet (M2), mg/ml	0.062	0.056	0.061	0.060	0.030	0.031	0.031	0.031
Konsentrasi Sampel (M1), mg/ml	6.27	5.61	6.15	6.01	2.91	3.13	3.09	3.09

Tabel A.2.1.5 Hasil Perhitungan Konsentrasi Xanthone dengan Variabel Pelarut Total 70 pada Ekstraksi Kedua

Keterangan	50 : 50			
	Run 1	Run 2	Run 3	Rata-Rata
Absorbansi	1.352	1.349	1.350	1.350
Konsentrasi kuvet (M2), mg/ml	0.032	0.032	0.032	0.032
Konsentrasi Sampel (M1), mg/ml	3.215	3.205	3.211	3.210

Tabel A.2.1.6 Hasil Perhitungan Konsentrasi Xanthone dengan Variabel Pelarut Total 70 pada Ekstraksi Ketiga

Keterangan	50 : 50			
	Run 1	Run 2	Run 3	Rata-Rata
Absorbansi	1.372	1.376	1.384	1.377
Konsentrasi kuvet (M2), mg/ml	0.032	0.033	0.033	0.033
Konsentrasi Sampel (M1), mg/ml	3.281	3.295	3.320	3.299

A.2.2 Coumarin

λ maksimum coumarin = 308 nm

Dari kurva kalibrasi coumarin, didapatkan persamaan : $y = 0,0076x^2 + 0,0039x$

Untuk menghitung konsentrasi pada variabel pelarut total 10 dengan perbandingan pelarut polar:non polar = 25:75, yaitu :

Absorbansi coumarin sampel = 2,5004

maka didapatkan konsentrasi kuvet (M2) sebagai berikut :

$$y = 0,0076x^2 + 0,0039x$$

$$y = 0,0076 (2,5004)^2 + 0,0039 (2,5004)$$

$$y = 0,0573 \text{ mg/ml}$$

Volume pengenceran sampel (V2) = 25,1 ml

Volume sampel awal (V1) = 0,1 ml

$$\text{Konsentrasi Sampel (M1)} = \frac{M2 \times V2}{V1}$$

$$= \frac{0,0573 \times 25,1}{0,1} = 14,374 \text{ mg/ml}$$

Tabel A.2.2.1 Hasil Perhitungan Konsentrasi Coumarin dengan Variabel Pelarut Total 10

Keterangan	25 : 75				50 : 50			
	Run 1	Run 2	Run 3	Rata-Rata	Run 1	Run 2	Run 3	Rata-Rata
Absorbansi	2.50	2.76	2.93	2.73	2.48	1.72	2.38	2.19
Konsentrasi kuvet (M2), mg/ml	0.057	0.069	0.077	0.067	0.098	0.029	0.052	0.046
Konsentrasi Sampel (M1), mg/ml	15.89	13.86	23.03	18.20	24.69	7.34	13.16	11.54

Tabel A.2.2.2 Hasil Perhitungan Konsentrasi Coumarin dengan Variabel Pelarut Total 30

Keterangan	25 : 75				50 : 50			
	Run 1	Run 2	Run 3	Rata-Rata	Run 1	Run 2	Run 3	Rata-Rata
Absorbansi	2.00	2.14	2.11	2.08	1.55	1.49	1.58	1.54
Konsentrasi kuvet (M2), mg/ml	0.04	0.04	0.04	0.04	0.02	0.02	0.03	0.02
Konsentrasi Sampel (M1), mg/ml	7.71	8.71	8.42	8.28	5.09	4.56	5.19	4.84

Tabel A.2.2.3 Hasil Perhitungan Konsentrasi Coumarin dengan Variabel Pelarut Total 50

Keterangan	25 : 75				50 : 50			
	Run 1	Run 2	Run 3	Rata-Rata	Run 1	Run 2	Run 3	Rata-Rata
Absorbansi	2.630	2.69	2.02	2.45	1.76	1.94	1.86	1.86
Konsentrasi kuvet (M2), mg/ml	0.06	0.07	0.04	0.06	0.03	0.04	0.03	0.03
Konsentrasi Sampel (M1), mg/ml	6.69	6.63	3.94	5.64	3.20	3.66	3.40	3.38

Tabel A.2.2.4 Hasil Perhitungan Konsentrasi Coumarin dengan Variabel Pelarut Total 70

Keterangan	25 : 75				50 : 50			
	Run 1	Run 2	Run 3	Rata-Rata	Run 1	Run 2	Run 3	Rata-Rata
Absorbansi	2.29	2.35	2.33	2.33	1.71	1.68	1.69	1.69
Konsentrasi kuvet (M2), mg/ml	0.05	0.06	0.05	0.05	0.03	0.03	0.03	0.03
Konsentrasi Sampel (M1), mg/ml	4.95	5.18	5.07	5.07	3.06	2.84	2.86	2.87

Tabel A.2.2.5 Hasil Perhitungan Konsentrasi Coumarin dengan Variabel Pelarut Total 70 pada Ekstraksi Kedua

Keterangan	50 : 50			
	Run 1	Run 2	Run 3	Rata-Rata
Absorbansi	1.753	1.749	1.751	1.751
Konsentrasi kuvet (M2), mg/ml	0.030	0.030	0.030	0.030
Konsentrasi Sampel (M1), mg/ml	3.050	3.036	3.042	3.043

Tabel A.2.2.6 Hasil Perhitungan Konsentrasi Coumarin dengan Variabel Pelarut Total 70 pada Ekstraksi Ketiga

Keterangan	50 : 50			
	Run 1	Run 2	Run 3	Rata-Rata
Absorbansi	1.776	1.783	1.780	1.780
Konsentrasi kuvet (M2), mg/ml	0.031	0.031	0.031	0.031
Konsentrasi Sampel (M1), mg/ml	3.122	3.142	3.134	3.133

A.3 Perhitungan Kadar Senyawa dalam PLF

A.3.1 Xanthone

Untuk menghitung kadar xanthone dalam PLF dapat dilakukan dengan cara sebagai berikut :

Volume PLF dari ekstraksi liquid-liquid = 13,1964 ml

Massa PLF = 4,013 gr

Massa Xanthone dalam PLF = Konsentrasi sampel x Volume PLF

$$= 15,8927 \text{ mg/ml} \times 13,1964 \text{ ml}$$

$$= 209,7266 \text{ mg}$$

$$\text{Kadar Xanthone dalam PLF} = \frac{\text{massa xanthone dalam PLF}}{\text{massa PLF}} \times 100 \%$$

$$= \frac{209,7266/1000}{4,013} \times 100 \%$$

$$= 5,2262 \%$$

Tabel A.3.1.1 Hasil Perhitungan Kadar Xanthone dengan Variabel Pelarut Total 10

Keterangan	25 : 75				50 : 50			
	Run 1	Run 2	Run 3	Rata-Rata	Run 1	Run 2	Run 3	Rata-Rata
Konsentrasi Sampel (M1), mg/ml	15.89	17.91	24.85	19.55	24.70	8.94	14.07	15.90
Volume PLF, ml	13.20	13.86	13.67	13.58	26.61	28.24	26.35	27.06
Massa Xanthone dalam PLF, gr	0.21	0.25	0.34	0.27	0.66	0.25	0.37	0.43
Massa PLF, gr	4.01	4.01	4.01	4.01	4.06	4.00	4.01	4.02
Kadar Xanthone dalam PLF	5.23	6.19	8.46	6.63	16.20	6.30	9.24	10.58

Tabel A.3.1.2 Hasil Perhitungan Kadar Xanthone dengan Variabel Pelarut Total 30

Keterangan	25 : 75				50 : 50			
	Run 1	Run 2	Run 3	Rata-Rata	Run 1	Run 2	Run 3	Rata-Rata
Konsentrasi Sampel (M1), mg/ml	8.47	8.55	8.53	8.52	5.09	5.37	5.11	5.19
Volume PLF, ml	39.9	40.5	40.2	40.2	85.3	85.0	87.9	86.1
Massa Xanthone dalam PLF, gr	0.34	0.35	0.34	0.34	0.43	0.46	0.45	0.45
Massa PLF, gr	4.02	4.06	4.17	4.08	4.02	4.03	4.11	4.06
Kadar Xanthone dalam PLF	8.43	8.52	8.21	8.39	10.79	11.33	10.92	11.01

Tabel A.3.1.3 Hasil Perhitungan Kadar Xanthone dengan Variabel Pelarut Total 50

Keterangan	25 : 75				50 : 50			
	Run 1	Run 2	Run 3	Rata-Rata	Run 1	Run 2	Run 3	Rata-Rata
Konsentrasi Sampel (M1), mg/ml	6.68	7.17	4.42	6.09	3.19	3.76	3.47	3.48
Volume PLF, ml	70.1	70.6	70.1	70.3	142.7	143.8	142.7	143.08
Massa Xanthone dalam PLF, gr	0.47	0.51	0.31	0.43	0.46	0.54	0.49	0.49
Massa PLF, gr	4.44	4.35	4.38	4.39	4.33	4.41	4.44	4.39
Kadar Xanthone dalam PLF	10.57	11.65	7.07	9.77	10.54	13.31	11.14	11.32

Tabel A.3.1.4 Hasil Perhitungan Kadar Xanthone dengan Variabel Pelarut Total 70

Keterangan	25 : 75				50 : 50			
	Run 1	Run 2	Run 3	Rata-Rata	Run 1	Run 2	Run 3	Rata-Rata
Konsentrasi Sampel (M1), mg/ml	4.95	5.18	5.07	6.01	2.91	2.84	2.86	3.09
Volume PLF, ml	100.6	100.4	100.4	100.5	203.0	202.9	203.2	203.1
Massa Xanthone dalam PLF, gr	0.498	0.520	0.509	0.604	0.590	0.576	0.582	0.628
Massa PLF, gr	4.37	4.52	4.44	4.44	4.15	4.16	4.11	4.14
Kadar Xanthone dalam PLF	11.39	11.49	11.45	13.59	14.21	13.84	14.15	15.17

Tabel A.3.1.5 Hasil Perhitungan Kadar Xanthone dengan Variabel Pelarut Total 70 pada Ekstraksi Kedua

Keterangan	50 : 50			
	Run 1	Run 2	Run 3	Rata-Rata
Konsentrasi Sampel (M1), mg/ml	3.215	3.205	3.211	3.210
Volume PLF, ml	198.280	197.840	196.619	197.580
Massa Xanthone dalam PLF, gr	0.637	0.634	0.631	0.634
Massa PLF, gr	4.116	4.171	4.170	4.152
Kadar Xanthone dalam PLF	15.487	15.204	15.141	15.277

Tabel A.3.1.6 Hasil Perhitungan Kadar Xanthone dengan Variabel Pelarut Total 70 pada Ekstraksi Ketiga

Keterangan	50 : 50			
	Run 1	Run 2	Run 3	Rata-Rata
Konsentrasi Sampel (M1), mg/ml	3.281	3.295	3.320	3.299
Volume PLF, ml	194.285	193.204	190.792	192.760
Massa Xanthone dalam PLF, gr	0.638	0.637	0.633	0.636
Massa PLF, gr	4.114	4.164	4.173	4.150
Kadar Xanthone dalam PLF	15.495	15.291	15.181	15.322

A.3.2 Coumarin

Untuk menghitung kadar coumarin dalam PLF dapat dilakukan dengan cara sebagai berikut :

Volume PLF dari ekstraksi liquid-liquid = 13,1964 ml

Massa PLF = 4,013 gr

Massa Xanthone dalam PLF = Konsentrasi sampel x Volume PLF
 = 14,374 mg/ml x 13,1964 ml
 = 189,6849 mg

$$\begin{aligned} \text{Kadar Xanthone dalam PLF} &= \frac{\text{massa coumarin dalam PLF}}{\text{massa PLF}} \times 100 \% \\ &= \frac{189,6849/1000}{4,013} \times 100 \% \\ &= 4,7268 \% \end{aligned}$$

Tabel A.3.2.1 Hasil Perhitungan Kadar Coumarin dengan Variabel Pelarut Total 10

Keterangan	25 : 75				50 : 50			
	Run 1	Run 2	Run 3	Rata-Rata	Run 1	Run 2	Run 3	Rata-Rata
Konsentrasi Sampel (M1), mg/ml	14.37	17.21	23.03	18.20	14.11	7.34	13.16	11.54
Volume PLF, ml	13.19	13.86	13.67	13.58	26.61	28.23	26.35	27.06
Massa Coumarin dalam PLF, gr	0.190	0.25	0.31	0.25	0.38	0.21	0.35	0.31
Massa PLF, gr	4.01	4.01	4.01	4.01	4.06	4.00	4.01	4.02
Kadar Coumarin dalam PLF	4.73	5.95	8.46	6.17	9.26	5.17	8.64	7.69

Tabel A.3.2.2 Hasil Perhitungan Kadar Coumarin dengan Variabel Pelarut Total 30

Keterangan	25 : 75				50 : 50			
	Run 1	Run 2	Run 3	Rata-Rata	Run 1	Run 2	Run 3	Rata-Rata
Konsentrasi Sampel (M1), mg/ml	7.71	8.71	8.42	8.28	4.89	4.56	5.06	4.84
Volume PLF, ml	39.98	40.48	40.19	40.21	85.29	85.04	87.88	86.07
Massa Coumarin dalam PLF, gr	0.31	0.35	0.34	0.33	0.42	0.39	0.44	0.42
Massa PLF, gr	4.02	4.06	4.17	4.08	4.02	4.03	4.11	4.06
Kadar Coumarin dalam PLF	7.68	8.67	8.11	8.15	10.38	9.62	10.82	10.27

Tabel A.3.2.3 Hasil Perhitungan Kadar Coumarin dengan Variabel Pelarut Total 50

Keterangan	25 : 75				50 : 50			
	Run 1	Run 2	Run 3	Rata-Rata	Run 1	Run 2	Run 3	Rata-Rata
Konsentrasi Sampel (M1), mg/ml	6.35	6.63	3.94	5.63	3.08	3.66	3.40	3.38
Volume PLF, ml	70.14	70.61	70.12	70.29	142.8	143.8	142.7	143.1
Massa Coumarin dalam PLF, gr	0.44	0.47	0.28	0.39	0.44	0.53	0.48	0.484
Massa PLF, gr	4.44	4.35	4.38	4.39	4.33	4.41	4.44	4.39
Kadar Coumarin dalam PLF	10.03	10.77	6.30	9.04	10.16	12.28	10.91	10.99

Tabel A.3.2.4 Hasil Perhitungan Kadar Coumarin dengan Variabel Pelarut Total 70

Keterangan	25 : 75				50 : 50			
	Run 1	Run 2	Run 3	Rata-Rata	Run 1	Run 2	Run 3	Rata-Rata
Konsentrasi Sampel (M1), mg/ml	4.95	5.18	5.07	5.07	2.91	2.84	2.86	2.87
Volume PLF, ml	100.6	100.4	100.4	100.5	203.1	202.9	203.2	203.1
Massa Coumarin dalam PLF, gr	0.498	0.520	0.509	0.509	0.590	0.576	0.582	0.583
Massa PLF, gr	4.37	4.53	4.45	4.45	4.15	4.16	4.11	4.14
Kadar Coumarin dalam PLF	11.39	11.49	11.45	11.45	14.21	13.84	14.15	14.06

Tabel A.3.2.5 Hasil Perhitungan Kadar Xanthone dengan Variabel Pelarut Total 70 pada Ekstraksi Kedua

Keterangan	50 : 50			
	Run 1	Run 2	Run 3	Rata-Rata
Konsentrasi Sampel (M1), mg/ml	3.05	3.04	3.04	3.04
Volume PLF, ml	198.28	197.84	196.62	197.58
Massa Xanthone dalam PLF, gr	0.605	0.601	0.598	0.601
Massa PLF, gr	4.12	4.17	4.17	4.15
Kadar Xanthone dalam PLF	14.69	14.40	14.34	14.48

Tabel A.3.2.6 Hasil Perhitungan Kadar Xanthone dengan Variabel Pelarut Total 70 pada Ekstraksi Ketiga

Keterangan	50 : 50			
	Run 1	Run 2	Run 3	Rata-Rata
Konsentrasi Sampel (M1), mg/ml	3.122	3.142	3.134	3.133
Volume PLF, ml	194.28	193.20	190.79	192.76
Massa Xanthone dalam PLF, gr	0.607	0.607	0.598	0.604
Massa PLF, gr	4.11	4.16	4.17	4.15
Kadar Xanthone dalam PLF	14.74	14.58	14.33	14.55

A.4 Perhitungan Yield Senyawa terhadap Daun Kering

$$\begin{aligned} \text{Yield crude ekstrak–daun kering (1)} &= \frac{\text{massa crude ekstrak}}{\text{massa daun kering}} \times 100 \% \\ &= \frac{88,7616}{345} \times 100 \% \\ &= 25,728 \% \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Yield crude ekstrak–daun kering (2)} &= \frac{\text{massa crude ekstrak}}{\text{massa daun kering}} \times 100 \% \\ &= \frac{32,599}{135} \times 100 \% \\ &= 24,147 \% \end{aligned}$$

$$\text{Average Yield} = \frac{25,728 \% + 24,147 \%}{2} = 24,938 \%$$

Untuk massa crude sebesar 5 gram, maka massa daun kering yang dibutuhkan ialah :

$$\begin{aligned} \text{Massa daun kering} &= \frac{\text{massa crude ekstrak}}{\text{average yield}} \\ &= \frac{5}{0,24938} = 20,0497 \text{ gram} \end{aligned}$$

A.4.1 Xanthone

Dari perhitungan di atas dapat dihitung yield xanthone terhadap daun kering :

$$\begin{aligned} \text{Yield} &= \frac{\text{massa xanthone dalam PLF}}{\text{massa daun kering}} \times 100 \% \\ &= \frac{209,7266/1000}{20,0497} \times 100 \% \\ &= 1,046 \% \end{aligned}$$

Tabel A.4.1.1 Hasil Perhitungan Yield Xanthone dengan Variabel Pelarut Total 10

Keterangan	25 : 75				50 : 50			
	Run 1	Run 2	Run 3	Rata-Rata	Run 1	Run 2	Run 3	Rata-Rata
Massa Xanthone dalam PLF, gr	0.210	0.248	0.340	0.266	0.657	0.252	0.371	0.427
Yield Xanthone dalam Daun Kering	1.046	1.238	1.694	1.326	3.279	1.258	1.849	2.129

Tabel A.4.1.2 Hasil Perhitungan Yield Xanthone dengan Variabel Pelarut Total 30

Keterangan	25 : 75				50 : 50			
	Run 1	Run 2	Run 3	Rata-Rata	Run 1	Run 2	Run 3	Rata-Rata
Massa Xanthone dalam PLF, gr	0.339	0.346	0.343	0.343	0.434	0.457	0.449	0.447
Yield Xanthone dalam Daun Kering	1.689	1.726	1.709	1.708	2.165	2.280	2.241	2.228

Tabel A.4.1.3 Hasil Perhitungan Yield Xanthone dengan Variabel Pelarut Total 50

Keterangan	25 : 75				50 : 50			
	Run 1	Run 2	Run 3	Rata-Rata	Run 1	Run 2	Run 3	Rata-Rata
Massa Xanthone dalam PLF, gr	0.469	0.507	0.310	0.428	0.456	0.542	0.495	0.498
Yield Xanthone dalam Daun Kering	2.339	2.527	1.545	2.137	2.276	2.702	2.469	2.482

Tabel A.4.1.4 Hasil Perhitungan Yield Xanthone dengan Variabel Pelarut Total 70

Keterangan	25 : 75				50 : 50			
	Run 1	Run 2	Run 3	Rata-Rata	Run 1	Run 2	Run 3	Rata-Rata
Massa Xanthone dalam PLF, gr	0.632	0.564	0.617	0.604	0.622	0.635	0.629	0.628
Yield Xanthone dalam Daun Kering	3.150	2.811	3.079	3.013	3.101	3.166	3.135	3.134

Tabel A.4.1.5 Hasil Perhitungan Yield Xanthone dengan Variabel Pelarut Total 70 pada Ekstraksi Kedua

Keterangan	50 : 50			
	Run 1	Run 2	Run 3	Rata-Rata
Massa Xanthone dalam PLF, gr	0.637	0.634	0.631	0.634
Yield Xanthone dalam Daun Kering	3.179	3.163	3.149	3.164

Tabel A.4.1.6 Hasil Perhitungan Yield Xanthone dengan Variabel Pelarut Total 70 pada Ekstraksi Ketiga

Keterangan	50 : 50			
	Run 1	Run 2	Run 3	Rata-Rata
Massa Xanthone dalam PLF, gr	0.638	0.637	0.633	0.636
Yield Xanthone dalam Daun Kering	3.180	3.175	3.160	3.172

A.4.2 Coumarin

Dari perhitungan di atas dapat dihitung yield coumarin terhadap daun kering :

$$\begin{aligned}
 \text{Yield} &= \frac{\text{massa coumarin dalam PLF}}{\text{massa daun kering}} \times 100 \% \\
 &= \frac{189,6849/1000}{20,0497} \times 100 \% \\
 &= 0,946 \%
 \end{aligned}$$

Tabel A.4.2.1 Hasil Perhitungan Yield Coumarin dengan Variabel Pelarut Total 10

Keterangan	25 : 75				50 : 50			
	Run 1	Run 2	Run 3	Rata-Rata	Run 1	Run 2	Run 3	Rata-Rata
Massa Coumarin dalam PLF, gr	0.190	0.239	0.315	0.248	0.376	0.207	0.347	0.310
Yield Coumarin dalam Daun Kering	0.946	1.190	1.570	1.235	1.873	1.034	1.730	1.546

Tabel A.4.2.2 Hasil Perhitungan Yield Coumarin dengan Variabel Pelarut Total 30

Keterangan	25 : 75				50 : 50			
	Run 1	Run 2	Run 3	Rata-Rata	Run 1	Run 2	Run 3	Rata-Rata
Massa Coumarin dalam PLF, gr	0.308	0.352	0.338	0.333	0.418	0.388	0.445	0.417
Yield Coumarin dalam Daun Kering	1.538	1.758	1.688	1.661	2.083	1.935	2.220	2.079

Tabel A.4.2.3 Hasil Perhitungan Yield Coumarin dengan Variabel Pelarut Total 50

Keterangan	25 : 75				50 : 50			
	Run 1	Run 2	Run 3	Rata-Rata	Run 1	Run 2	Run 3	Rata-Rata
Massa Coumarin dalam PLF, gr	0.445	0.468	0.310	0.397	0.44	0.53	0.48	0.484
Yield Coumarin dalam Daun Kering	2.220	2.335	1.378	1.978	2.19	2.62	2.42	2.412

Tabel A.4.2.4 Hasil Perhitungan Yield Coumarin dengan Variabel Pelarut Total 70

Keterangan	25 : 75				50 : 50			
	Run 1	Run 2	Run 3	Rata-Rata	Run 1	Run 2	Run 3	Rata-Rata
Massa Coumarin dalam PLF, gr	0.49	0.520	0.509	0.509	0.59	0.58	0.58	0.583
Yield Coumarin dalam Daun Kering	2.49	2.594	2.540	2.540	2.94	2.87	2.90	2.906

Tabel A.4.2.5 Hasil Perhitungan Yield Coumarin dengan Variabel Pelarut Total 70 pada Ekstraksi Kedua

Keterangan	50 : 50			
	Run 1	Run 2	Run 3	Rata-Rata
Massa Xanthone dalam PLF, gr	0.605	0.601	0.598	0.601
Yield Xanthone dalam Daun Kering	3.016	2.996	2.983	2.998

Tabel A.4.2.6 Hasil Perhitungan Yield Coumarin dengan Variabel Pelarut Total 70 pada Ekstraksi Ketiga

Keterangan	50 : 50			
	Run 1	Run 2	Run 3	Rata-Rata
Massa Xanthone dalam PLF, gr	0.607	0.607	0.598	0.604
Yield Xanthone dalam Daun Kering	3.025	3.028	2.983	3.012

A.5 Perhitungan Recovery Senyawa terhadap Crude Ekstrak

Proses distilasi yang dilakukan menggunakan temperatur 68°C. Maka berdasarkan data perbedaan titik didih antara senyawa xanthone (349-350 °C) dan coumarin (298°C) dengan methanol (68°C). Sehingga dapat disimpulkan tidak terdapat senyawa xanthone dan coumarin yang ikut terlarut ke dalam methanol pada

saat dilakukan proses distilasi. Sehingga methanol setelah proses distilasi pun tidak diperhitungkan untuk perhitungan recovery.

A.5.1 Xanthone

Berdasarkan perhitungan yang telah dilakukan sebelumnya maka diketahui jika sampel memiliki :

λ maksimum xanthone = 332 nm

Absorbansi xanthone sampel = 2,1898

Dari persamaan kurva kalibrasi xanthone, didapatkan :

M2 = 0,0633 mg/ml dan M1 = 15,8927 mg/ml

Maka untuk menghitung kadar xanthone dalam feed

$$= \frac{\text{massa xanthone di feed}}{\text{massa feed}} \times 100 = \frac{66,5433/1000}{0,5} \times 100 \% \\ = 13,3087 \%$$

Sehingga massa xanthone dalam 5 gram crude ekstrak :

$$= \frac{\text{massa xanthone di feed}}{\text{massa feed}} \times \text{massa crude ekstrak} \\ = \frac{66,5433/1000}{0,5} \times 5 \text{ gram} = 0,6654 \text{ gram} = 665,4 \text{ mg}$$

Recovery xanthone dalam crude ekstrak :

$$= \frac{\text{massa xanthone di PLF}}{\text{massa xanthone di crude ekstrak}} \times 100 \% \\ = \frac{209,7266}{665,4} \times 100 = 31,5173 \%$$

A.5.2 Coumarin

Berdasarkan perhitungan yang telah dilakukan sebelumnya maka diketahui jika sampel memiliki :

λ maksimum coumarin = 308 nm

Absorbansi xanthone sampel = 2,5004

Dari persamaan kurva kalibrasi xanthone, didapatkan :

M2 = 0,0573 mg/ml dan M1 = 14,374 mg/ml

Maka untuk menghitung kadar xanthone dalam feed :

$$= \frac{\text{massa coumarin di feed}}{\text{massa feed}} \times 100 \% = \frac{62,9111/1000}{0,5} \times 100 \% \\ = 12,5822 \%$$

Sehingga massa xanthone dalam 5 gram crude ekstrak :

$$= \frac{\text{massa coumarin di feed}}{\text{massa feed}} \times \text{massa crude ekstrak}$$

$$= \frac{62,9111/1000}{0,5} \times 5 \text{ gram} = 0,6291 \text{ gram} = 629,1108 \text{ mg}$$

Recovery xanthone dalam crude ekstrak :

$$= \frac{\text{massa coumarin di PLF}}{\text{massa coumarin di crude ekstrak}} \times 100 \%$$

$$= \frac{189,6849}{662,1108} \times 100 \%$$

$$= 30,1513 \%$$

Tabel A.5.1 Hasil Perhitungan Recovery Xanthone dan Coumarin dengan Variabel Pelarut Total 10

Keterangan	25 : 75				50 : 50			
	Run 1	Run 2	Run 3	Rata-Rata	Run 1	Run 2	Run 3	Rata-Rata
Recovery xanthone	31.517	37.312	51.042	39.957	98.784	37.919	55.701	64.135
Recovery coumarin	30.151	37.926	50.047	39.375	59.701	32.938	55.135	49.258

Tabel A.5.2 Hasil Perhitungan Recovery Xanthone dan Coumarin dengan Variabel Pelarut Total 30

Keterangan	25 : 75				50 : 50			
	Run 1	Run 2	Run 3	Rata-Rata	Run 1	Run 2	Run 3	Rata-Rata
Recovery xanthone	50.898	52.015	51.501	51.471	65.237	68.687	67.512	67.145
Recovery coumarin	49.024	56.020	53.787	52.944	66.396	61.676	70.743	66.272

Tabel A.5.3 Hasil Perhitungan Recovery Xanthone dan Coumarin dengan Variabel Pelarut Total 50

Keterangan	25 : 75				50 : 50			
	Run 1	Run 2	Run 3	Rata-Rata	Run 1	Run 2	Run 3	Rata-Rata
Recovery xanthone	70.482	76.132	46.557	64.390	68.587	81.399	74.383	74.790
Recovery coumarin	70.755	74.429	43.903	63.029	69.920	83.541	77.109	76.856

Tabel A.5.4 Hasil Perhitungan Recovery Xanthone dan Coumarin dengan Variabel Pelarut Total 70

Keterangan	25 : 75				50 : 50			
	Run 1	Run 2	Run 3	Rata-Rata	Run 1	Run 2	Run 3	Rata-Rata
Recovery xanthone	94.907	84.699	92.779	90.795	93.449	95.379	94.472	94.433
Recovery coumarin	79.229	82.659	80.958	80.949	93.843	91.576	92.455	92.625

Tabel A.5.5 Hasil Perhitungan Recovery Xanthone dan Coumarin dengan Variabel Pelarut Total 70 pada Ekstraksi Kedua

Keterangan	50 : 50			
	Run 1	Run 2	Run 3	Rata-Rata
Recovery xanthone	95.794	95.292	94.877	95.321
Recovery coumarin	96.127	95.468	95.071	95.556

Tabel A.5.6 Hasil Perhitungan Recovery Xanthone dan Coumarin dengan Variabel Pelarut Total 70 pada Ekstraksi Ketiga

Keterangan	50 : 50			
	Run 1	Run 2	Run 3	Rata-Rata
Recovery xanthone	95.809	95.676	95.198	95.561
Recovery coumarin	96.414	96.492	95.059	95.988